

**MEIRE DE OLIVEIRA BARBOSA**

**PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PEPTÍDIOS  
SINTETIZADOS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE  
SOJA (*Glycine max* [L.] Merrill)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004

**MEIRE DE OLIVEIRA BARBOSA**

**PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PEPTÍDIOS  
SINTETIZADOS DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE  
SOJA (*Glycine max* [L.] Merrill)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 30 de Julho de 2004.

---

Prof.a. Elizabeth Pacheco Batista Fontes  
(Conselheira)

---

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro  
(Conselheiro)

---

Prof. Marcelo Matos Santoro

---

Dra. Virgínia Maria Chaves Alves

---

Prof.a. Maria Cristina Baracat-Pereira  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, pela presença em todos os momentos da minha vida;

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso;

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/DBB da Universidade Federal de Viçosa, pelo auxílio constante;

À FAPEMIG, pelo auxílio financeiro;

À Professora Maria Cristina Baracat Pereira, pela orientação, apoio, amizade e presença constante no decorrer deste treinamento;

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes/DBB, pelo apoio e por ter disponibilizado o seu laboratório para a realização deste projeto;

Ao Professor Reginaldo da Silva Romeiro/DFP/UFV, pela ajuda durante a realização dos testes de atividade antimicrobiana;

À Dra. Virgínia Maria Chaves Alves/DMB/UFV, pela colaboração e orientação durante a realização das cromatografias de fase reversa;

Ao Professor Marcelo Matos Santoro/UFMG, pela colaboração e orientação durante a realização das cromatografias de fase reversa e da espectrometria de massa, e sugestões ao trabalho;

Aos Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFV, pelo apoio científico;

Aos amigos do Laboratório de Purificação e Expressão de Proteínas e do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas/BIOAGRO/UFV, pela agradável convivência dentro e fora do laboratório;

Aos amigos Marília, Felipe, Hebréia, Carlos, Rubens e Eliane, do Laboratório de Purificação e Expressão de Proteínas/UFV, pela importante ajuda na realização deste trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas/UFMG, pelo apoio;

Ao Jamil, do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas/UFMG, pelo grande auxílio durante a realização deste trabalho;

Ao meu marido, pelo companheirismo e incentivo durante a realização deste curso;

Aos meus queridos pais e ao meu irmão, por todo apoio e incentivo para a realização deste curso.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
Lista de Figuras.....	V
Lista de Tabelas.....	VIII
Lista de Abreviaturas.....	IX
Resumo.....	X
Abstract .....	XII
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	3
2.1. Peptídios antimicrobianos.....	3
2.1.1. Classificação dos peptídios antimicrobianos.....	3
2.1.2. Peptídios catiônicos e aniônicos .....	4
2.1.3. Peptídios de animais.....	5
2.1.4. Peptídios de insetos.....	6
2.1.5. Peptídios de plantas.....	7
2.2. Mecanismos de defesa em vegetais.....	8
2.2.1. Diversidade e classificação dos peptídios vegetais.....	9
2.3. Mecanismos de ação dos peptídios antimicrobianos.....	13
2.4. Aplicações e aspectos gerais do peptídios antimicrobianos.....	17
3. Objetivos.....	21
4. Material e Métodos.....	22
4.1. Infra-estrutura.....	22
4.2. Materiais .....	22
4.3. Microrganismos.....	23
4.4. Material vegetal e condições de germinação, coleta e armazenamento da soja.....	23
4.5. Extração e purificação dos peptídios de semente madura e germinada de soja.....	23
4.6. Cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sepharose.....	25
4.7. Cromatografia de troca catiônica em CM -Sepharose.....	26
4.8. Cromatografia de fase reversa em coluna C18.....	26
4.9. Testes de inibição dos patógenos.....	27
4.10. Caracterização dos peptídios.....	28

4.10.1 Determinação da massa molecular por espectrometria de massa..	28
4.10.2 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em presença de tricina (SDS-Tricina).....	28
5. Resultados e Discussão .....	30
5.1. Identificação de peptídios sintetizados durante a germinação de sementes de soja quando comparadas com sementes não germinadas.....	30
5.2. Purificação dos peptídios sementes de soja germinadas por 48 h. ....	39
5.3. Avaliação da atividade antibacteriana dos peptídios parcialmente purificados sintetizados durante um período de germinação de 48 h das sementes de soja.....	58
6. Conclusões.....	65
7. Perspectivas.....	66
8. Referências Bibliográficas.....	67

## INDICE DE FIGURAS

Página

FIGURA 01 - Modelo de mecanismo de ação de peptídio antimicrobianos.....	15
FIGURA 02 - O alvo nas membranas dos peptídios antimicrobianos e as bases da especificidade .....	16
FIGURA 03 - Murcha bacteriana do tomateiro, iniciada por <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	19
FIGURA 04 – Sintoma do cancro: à esquerda, gênese do sintoma; à direita, cancro-do-tomateiro ( <i>Clavibacter michiganensis</i> , subsp. <i>michiganensis</i> ).....	19
FIGURA 05 - Fluxograma dos procedimentos utilizados na purificação dos peptídios presentes nas sementes não germinadas e germinadas de soja.....	25
FIGURA 06 – Sementes de soja - Visualização da semente não germinada e sementes germinadas por períodos de 24, 48, 72, e 96 h de germinação.....	31
FIGURA 07 – Cromatografias de troca aniônica (tipo FPLC) em coluna DEAE-Sepharose (8,0 mL) dos extratos de sementes de soja da variedade UFV 16, precipitados com sulfato de amônio (35% sat.) e aquecidos a 80 °C / 15 min.....	32
FIGURA 08 – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16,5% T) em presença de Tricina dos pools formados pelas frações eluídas da cromatografia de troca aniônica (TA) de extratos de sementes germinadas por 24 e 48 h, após aquecimento seletivo e também o extrato de semente não germinada após aquecimento. ....	34
FIGURA 09 - Cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC dos pools catiônicos da cromatografia de troca aniônica.....	36
FIGURA 10 – Cromatografias de fase reversa em C18-HPLC dos pools catiônicos (Figura 07) de sementes germinadas por diferentes tempos e sementes não germinadas de soja UFV 16. Duas regiões com picos protéicos com síntese diferenciada estão destacados.....	38
FIGURA 11 – Cromatografia de troca aniônica a baixa pressão em coluna DEAE-Sepharose (20,0 mL) do extrato de sementes de soja germinadas por 48 h, da variedade UFV 16, precipitado com sulfato de amônio (35% sat.) e aquecido a 80 °C / 15 min.	40
FIGURA 12 - Fluxograma da distribuição (em mL) do pool catiônico da cromatografia de troca aniônica, conforme etapas de uso...	



FIGURA 23 – Cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC do pool catiônico da cromatografia de troca catiônica de semente de soja germinada por 48 h não congelada (linha escura) e congelada e descongelada (linha clara).....	53
FIGURA 24- Espectrometria de massa do eluato do pico 5*, eluído em 18,54% de acetonitrila na cromatografia de fase reversa (Figura 22) do polo da fração catiônica eluído com 0,35 M de NaCl da cromatografia de troca catiônica (Figura 13 C).....	56
FIGURA 25 - Espectrometria de massa do eluato do pico 8*, eluído em 32,06% de acetonitrila na cromatografia de fase reversa (Figura 22) do polo da fração catiônica eluído com 0,35 M de NaCl da cromatografia de troca catiônica (Figura 13C).....	57
FIGURA 26 - Espectrometria de massa do eluato do pico 16*, eluído em 31,4% de acetonitrila na cromatografia de fase reversa (Figura 22) do pool da fração catiônica eluído com 0,35 M de NaCl da cromatografia de troca catiônica (Figura 13 C).....	58
FIGURA 27 - Testes de inibição do crescimento da bactéria <i>Ralstonia solanacearum</i> em duas concentrações diferentes (10 e 30µL) do pool catiônico eluído da cromatografia de troca aniônica (T. An) de sementes de soja germinadas por 48h (Figura 11).....	59
FIGURA 28 - Testes de inibição do crescimento da bactéria <i>Clavibacter michiganensis</i> em duas concentrações diferentes (10 e 30 µL) do pool catiônico eluído da cromatografia de troca aniônica (T. An) de sementes de soja germinadas por 48h.	60
FIGURA 29 - Testes de inibição do crescimento da bactéria <i>Ralstonia solanacearum</i> do pool catiônico eluído da cromatografia de troca Catiônica (T. Cat - Figura 13) de sementes de soja germinadas por 48h. ....	62
FIGURA 30 - Testes de inibição do crescimento da bactéria <i>Clavibacter michiganensis</i> do pool catiônico eluído da cromatografia de troca Catiônica (T. Cat) de sementes de soja germinadas por 48h.....	63

## INDICE DE TABELAS

## Página

TABELA 01 - Famílias de peptídios antimicrobianos vegetais.....	13
TABELA 02 - Gradiente descontínuo de eluição das na cromatografia de fase reversa (HPLC), sendo a solução A formada por TFA 0,1% (v/v) e a B, por TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v).....	35
TABELA 03 - Tempo de retenção e concentração de acetonitrila (% v/v) dos 14 picos protéicos sintetizados em sementes de soja germinadas por 48 h, separados por cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC.....	50
TABELA 04 - Tempo de retenção e concentração de acetonitrila (% v/v) de 18 picos protéicos sintetizados em sementes de soja germinadas por 48 h, após congelamento e descongelamento da fração catiônica e separação por cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

BIS	N,N', metileno-bis-acrilamida
CM	Carboximetil
DEAE	Dietilaminoetil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
MES	Ácido 2-[N-morfolino]etanosulfônico
MM	Massa molecular
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TFA	Ácido trifluoracético
TRICINA	N-Tris(Hidroximetil)metilglicina
TRIS	Tris(Hidroximetil)aminometano

## RESUMO

BARBOSA, Meire de Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2004. **Purificação e Atividade Antibacteriana de Peptídios Sintetizados Durante a Germinação de Sementes de Soja (*Glycine Max* [L.] Merrill).** Orientadora: Maria Cristina Baracat Pereira. Conselheiros: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Reginaldo da Silva Romeiro.

Peptídios antimicrobianos (AMPs) são produzidos por animais, plantas, insetos e outros organismos como estratégia de defesa eficiente, flexível, com consumo mínimo de energia e biomassa, em função de seu pequeno tamanho. Em vegetais, foram identificadas dez famílias de AMPs como parte da barreira constitutiva de defesa da planta, com massas moleculares que variam de 2 a 9 kDa. Este trabalho visou identificar e purificar peptídios de sementes de soja sintetizados durante a germinação e avaliar a atividade antibacteriana, com o objetivo de desenvolver defensivos agrícolas naturais e agentes antimicrobianos para as indústrias farmacêutica e veterinária. Sementes de soja da variedade UFV 16 (*Glycine max* [L.] Merrill) foram germinadas por 24, 48, 72 e 96 h, trituradas e maceradas em 2,5 volumes do tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0 contendo EDTA, PMSF e benzamidina. As sementes não germinadas foram moídas e adicionadas de tampão fosfato de sódio 25 mM na proporção de 1:5, contendo KCL, EDTA, tiouréia, PMSF e benzamidina. Os homogenatos de ambas foram mantidos sob agitação branda em geladeira por 2 h, centrifugados, e os sobrenadantes foram precipitados com sulfato de amônio. Cada sobrenadante foi aquecido a 80°C/15 min para precipitação diferencial de proteínas, e centrifugado. Seguiu-se cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, em equipamento tipo FPLC. O pool catiônico obtido foi submetido à cromatografia de troca catiônica em coluna CM-Sepharose com tampão MES 25 mM, pH 6,0, em equipamento tipo FPLC, e o pico eluído em 0,35 M de NaCl foi submetido à cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC. Os perfis obtidos após cromatografia de fase reversa das sementes germinadas e não germinadas foram comparados para análise dos AMPs sintetizados durante a germinação. A semente germinada por 48 h mostrou duas regiões de síntese de diferentes proteínas. Foram realizados testes de atividade antimicrobiana

utilizando o pool catiônico após troca aniônica e o pico eluído com 0,35 M de NaCl após troca catiônica, para as bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum* (gram-negativa) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (gram-positiva), mostrando inibição parcial e total para os extratos após troca aniônica e catiônica, respectivamente. Paralelamente, análises de espectrometria de massa com os extratos obtidos após RP-HPLC indicaram a presença de peptídeo de 1 a 9 kDa e de proteína de massa maior que 20 kDa, em regiões do perfil cromatográfico correspondentes à eluição em concentrações inferiores e superiores a 40% de acetonitrila, respectivamente. Outros picos peptídicos sintetizados durante a germinação por 48, estão sendo submetidos a análises de espectrometria de massa, seqüenciamento e testes antimicrobianos, visando selecionar peptídios efetivos contra fitopatógenos de interesse.

## ABSTRACT

BARBOSA, Meire de Oliveira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July of 2004.  
**Purification and Antibacterial Activity of Synthesized Peptides During the Germination of Soybean Seeds (*Glycine Max* [L.] Merrill).** Advisor: Maria Cristina Baracat Pereira. Committee Members: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Reginaldo da Silva Romeiro.

Antimicrobial peptides (AMPs) they are produced by animals, plants, insects and other organisms as strategy of efficient, flexible defense, with minimum consumption of energy and biomass, in function of its small size. In plants, they were identified ten families of AMPs as part of the constituent barrier of defense of the plant, with molecular masses that vary of 2 to 9 kDa. This work aiming t to identify and to purify peptides of soybean seeds synthesized during the germination and to evaluate the antibacterial activity, objectifying the development of defensive agricultural natural and agents antimicrobial for the pharmaceutical and veterinary industries. Soybean of seeds of the variety UFV 16 (*Glycine max* [L.] Merrill) they were germinated by 24, 48, 72 and 96 h, triturated in the proportion of 1:2,5 using Tris-HCl buffer 0,1 M, pH 7,0 contends EDTA, PMSF and benzamidine. The no germinated seeds were triturated and added of phosphate of sodium buffer 25 mM in the proportion of 1:5, containing KCL, EDTA, thiourea, PMSF and benzamidine. . Both obtained extracts were maintained under agitation and ice-bath in refrigerator for 2 h, and centrifuged . As the first step of purification procedure, protein extracts were recovered after ammonium sulfate precipitation and centrifugation, heating up to 80°C/15 min for precipitation of proteins and a new centrifugation. Anion-exchange chromatography was followed in column DEAE-Sepharose using Tris-HCl buffer, 25 mM, pH 7.0 in equipment type FPLC. The obtained cationic pool was submitted to the cationic exchange cromatography in column CM Sepharose using MES buffer 25 mM, pH 6,0, in equipment type FPLC, and a fraction were recovered in NaCl 0,35 M, that was submitted to a C18-RP-HPLC. The obtained RP-HPLC profiles of the germinated and no-germinated seeds were compared each other and two different groups of proteins were observed when seeds were germinated by 48 h, if compared with no-germinated seeds, indicating expression of different proteins. Tests of antimicrobial activity

were realized using the anionic-exchange pool and the cationic exchange-pool, against the plant pathogens *Ralstonia solanacearum* (Gram-negative) and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Gram-positive), showing partial- or full-inhibition, respectively . Simultaneously, analysis of mass spectrometry with the C18-RP-HPLC extracts shows peptides (1 to 9 kDa) and proteins (20 kDa in areas of the profile chromatography corresponding to the eluted in inferior and superior concentrations at 40% of acetonitrile). Other peptide fractions were submitted to the mass spectrometry analysis, amino acids-sequence determination, and antimicrobial test, aiming to select effective peptides to control important plant pathogens of commercial interest.

## 1 - INTRODUÇÃO

Os organismos, incluindo-se plantas e animais, estão continuamente expostos a múltiplos patógenos potenciais, adquiridos por meio de ingestão, contato com superfícies infectadas e inalação, durante toda a vida. Entretanto, as infecções microbianas que ameaçam os indivíduos não ocorrem frequentemente, o que pode ser explicado pelo elevado número de mecanismos efetivos que restringem o crescimento microbiano no interior dos tecidos.

Peptídios antimicrobianos são produzidos por animais, insetos e plantas, dentre outros organismos, como uma estratégia de defesa eficiente, flexível e com consumo mínimo de energia e biomassa, em função de seu pequeno tamanho. Em vegetais, foram identificadas dez famílias de peptídios antimicrobianos, como parte da barreira constitutiva de defesa da planta, com massas moleculares variando de 2 a 9 kDa.

A resistência aos agrotóxicos desenvolvida pelos microrganismos fitopatogênicos de importância agrônômica é considerado um fator limitante na eficácia e na vida útil das mais variadas estratégias de controle de doenças vegetais. Diversos fungos têm desenvolvido estratégias de resistência contra os fungicidas disponíveis comercialmente. Nos últimos anos, tem-se constatado que, mesmo fungicidas de amplo espectro de ação, como o Benomyl, tornaram-se alvo de resistência.

Os produtos naturais diversos, podendo-se incluir aqui os peptídios antimicrobianos, representam uma rica fonte de compostos a serem explorados na seleção de novos agentes de defesa para a agroindústria. Como principais características destes produtos naturais, podem-se citar a baixa toxicidade para humanos e vida selvagem, o baixo impacto ambiental, a presença de baixa quantidade de resíduos em alimentos e a compatibilidade com o manejo integrado de peste, o que é de especial importância para o controle de pragas e doenças de plantas.

Outro fator relevante são as doenças infecciosas, as quais estão entre as principais causas de morte da população humana. Esse fato é causado, em grande parte, pelo surgimento de microrganismos multi-resistentes aos antibióticos. Portanto, apesar da disponibilidade de um grande número de

antibióticos de última geração, torna-se ainda fundamental a busca por compostos que possam atuar como novas drogas a serem utilizadas no combate às doenças infecciosas. Os peptídios antimicrobianos vêm sendo então avaliados como agentes terapêuticos para uso em humanos e também para animais, à semelhança de antibióticos. Entretanto, pouco se conhece sobre a forma de penetração, a toxicidade potencial e o custo de produção destes peptídios ou de compostos análogos.

O uso de novas tecnologias para o desenvolvimento de drogas mais eficazes constitui uma estratégia promissora no campo da biotecnologia, já que novas classes de moléculas naturais e/ou sintéticas poderão ser utilizadas como defesa dos organismos.

Este trabalho teve como objetivo identificar e purificar peptídios antimicrobianos sintetizados durante a germinação de sementes de soja, visando sua caracterização bioquímica e estrutural para posterior utilização desses como defensivos naturais para plantas e agentes antimicrobianos para animais.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - Peptídios antimicrobianos

Muitos organismos eucarióticos apresentam mecanismos que restringem o desenvolvimento de microrganismos dentro de seus tecidos (Zasloff, 2002). Uma estratégia de defesa que envolve a produção de pequenos peptídios contra microrganismos é reconhecida de longa data e muito difundida entre os organismos. Estes peptídios com características antimicrobianas, podem ser prontamente sintetizados de uma maneira flexível e com um consumo mínimo de energia e biomassa em função de seu tamanho pequeno, sendo no geral originados pelos mecanismos de defesa (Broekaert *et al.*, 1995; Zasloff, 2002).

#### 2.1.1 - Classificação dos peptídios antimicrobianos

Peptídios antimicrobianos de várias espécies vivas diferem amplamente no tamanho, na composição de aminoácidos e no padrão de enovelamento (Thevissen *et al.*, 2000), que são reflexos de diferenças na sua seqüência primária, seja por mudanças nas posições dos resíduos, número de ligações dissulfeto e número de resíduos de aminoácidos constituintes. Uma análise do perfil de atividade biológica destes peptídios indicou que existe alta variabilidade, não sendo fácil generalizar sua classificação com base no comprimento de cadeia, carga e presença ou ausência de ligações dissulfeto (Hancock *et al.*, 2002). Muitos desses peptídios possuem ampla atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e/ou gram-negativas, fungos, vírus ou protozoários (Thevissen *et al.*, 1996).

Uma classe de peptídios antimicrobianos corresponde a pequenos peptídios lineares (20 a 40 aminoácidos) que formam  $\alpha$ -hélice anfipática. Esses peptídios se associam com os lipídios da membrana das células-alvo, formando os canais iônicos. Esta classe é bem representada pelas cecropinas presentes nas hemolinhas de muitos invertebrados, em respostas a injúrias ou infecções, e pelas magaininas, secretadas por glândulas da pele de anfíbios (Broekaert *et al.*, 1997). Os peptídios lineares também podem ser ricos em um determinado tipo de

aminoácido, tais como prolina, histidina e triptofano, tendo como exemplo, a indolicidina bovina (Rozek *et al.*, 2000).

Uma segunda classe de peptídios antimicrobianos é formada pelos peptídios ricos em cisteína, que apresentam um padrão de estrutura tridimensional complexa estabilizado por cisteínas, predominando estruturas folhas  $\beta$  antiparalelas. Esta numerosa classe envolve peptídios diferindo no comprimento, número de cisteínas, número de ligações dissulfeto ou padrão de enovelamento (Boman, 1995).

A maioria dos peptídios antimicrobianos isolados contém quatro, seis ou oito cisteínas, apresentando pontes dissulfeto, o que lhes confere alta estabilidade. Embora pouco estudados, esses peptídios aparentam exercer efeito antimicrobiano em membrana plasmática (Broekaert *et al.*, 1997).

Todos os peptídios antimicrobianos são derivados de grandes precursores, incluindo uma seqüência sinal. Modificações pós-traducionais, incluindo processamento proteolítico e, em alguns casos, glicosilação (Bulet *et al.*, 1993), amidação carboxi-terminal, isomerização aminoacídica (Simmaco *et al.*, 1998) e halogenação são importantes para o rearranjo final dos peptídios (Zasloff, 2002, citando vários autores). Um padrão complexo de modificações envolve a ciclização de dois pequenos peptídios, levando à formação de um peptídio completamente circular, a  $\alpha$ -defensina isolada de neutrófilos de macaco *Rhesus* (Tang *et al.*, 1999). Alguns peptídios são originados por proteólise de grandes proteínas, como a buforina II, originada da histona 2A, e a lactoferricina, originada da lactoferrina (Zasloff, 2002, citando vários autores).

### **2.1.2 - Peptídios catiônicos e aniônicos**

Peptídios catiônicos são importantes componentes da defesa de todas as espécies de vida (Hancock, 2000). Esses peptídios podem ter uma surpreendente variedade de atividades, incluindo ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, amplo espectro antifúngico e antiviral, capacidade de eliminar células neoplásicas (atividade anti-cancerígena) e uma variedade de outras atividades que incluem a atividade quimiostática, anti-endotóxica e cicatrizante. Essas

características fornecem as bases para a construção de plantas e animais transgênicos resistentes a doenças (Hancock *et al.*, 1998; Hancock *et.al*, 2002).

Os peptídios aniônicos são pouco conhecidos e foram inicialmente isolados de pulmões de anfíbios. Foram descritos três pequenos peptídios (721,6 Da, 823,7 Da e peptídios hidrofílicos contendo regiões homopoliméricas com cinco a sete resíduos de ácido aspártico), que podem ser produzidos no epitélio respiratório com atividade antimicrobiana contra *Pasteurella heomolytica* na presença de  $Zn^{2+}$  (Kalfa, 1999; Lai, 2002). Os peptídios aniônicos também existem naturalmente como parte do sistema de defesa inata de anfíbios, e seu espectro antimicrobiano e mecanismo de ação ainda não são bem estabelecidos (Lai, 2002).

### 2.1.3 - Peptídios de animais

Diferentes tipos de peptídios antimicrobianos, e de várias classes, podem estar presentes em um único animal. Existem possíveis razões para essa variação:

- O espectro de ação antimicrobiana de alguns peptídios tende a ser incompleto, sendo então necessária a síntese de outros peptídios com ação complementar;
- Diferentes peptídios trabalham em sinergismo contra microrganismos;
- Muitos peptídios podem apresentar outros tipos de atividade não antimicrobiana, como anti-endotóxica, quimiostática e pró-antiinflamatória dentre outras.

Os peptídios tendem a ser produzidos por diferentes tipos de células, de maneira que estes tecidos induzem diferentes graus de expressão aos peptídios de interesse naquelas células e naquele momento fisiológico (Hancock, 2000).

Os peptídios antimicrobianos de animais representam a primeira barreira de defesa do organismo. Quando as células da mucosa dos epitélios de revestimento dos tratos gastrointestinal e respiratório produzem os peptídios, estas moléculas são efetivas como parte da resposta imune. Como representantes, podemos citar as defensas de mamíferos com massas moleculares de 3,5 a 4,5 kDa, que são produzidas de maneira induzida, em

resposta a ataques de patógenos, por várias células especializadas nos corpos dos mamíferos (Lehrer *et al.*, 1993; Ganz e Lehrer, 1994). Podemos citar também as catelicidinas, que são abundantes em mamíferos e são originadas de proteínas precursoras do domínio inibidor amino-terminal da catepsina L (catelina) (Lehrer e Ganz, 2002). Os humanos produzem somente uma catelicidina, a LL-37, composta por 37 aminoácidos e encontrada em vários epitélios e em neutrófilos, que atuam como uma primeira barreira de defesa (Hiemstra, 2001).

Os peptídios antimicrobianos vêm também sendo avaliados como agentes terapêuticos em animais e humanos (Ganz e Lehrer, 1999), à semelhança dos antibióticos em uso. Estudos de peptídios antimicrobianos provêm novas possibilidades para o tratamento de doenças já que a dinâmica de interações entre microrganismo e hospedeiro são bastante complexas. Os peptídios antimicrobianos de eucariotos superiores diferem estruturalmente dos antibióticos convencionais produzidos por bactérias e fungos e com isso oferecem novas possibilidades de compostos farmacêuticos, podendo estes ser efetivos contra o aumento da resistência microbiana (Ganz e Lehrer, 1999).

#### **2.1.4 - Peptídios de insetos**

Os insetos são particularmente resistentes a microrganismos. Seu sistema de defesa atua desencadeando um conjunto de reações, incluindo-se a produção de moléculas citotóxicas, a fagocitose de bactérias ou a encapsulação de parasitas grandes pelas células da hemolinfa, e ainda a síntese induzida de um conjunto de peptídios ou proteínas secretados na hemolinfa, onde atuam sinergisticamente, visando destruir os organismos invasores (Hoffmann, 1995).

O sistema de defesa dos insetos hospedeiros compartilha várias características básicas com o sistema de resposta da fase aguda de mamíferos infectados, especialmente ao nível do controle de expressão gênica de proteínas e peptídios envolvidos na defesa (Hoffmann, 1995). Os diversos peptídios antimicrobianos de insetos podem ser agrupados em quatro classes, segundo Papagianni (2003):

(1) as cecropinas, peptídios catiônicos com 31 a 39 resíduos de aminoácidos (nove resíduos de cisteína) e uma região de  $\alpha$ -hélice anfipática

(Papagianni, 2003). Estes peptídios atuam especialmente sobre bactérias gram-negativas e possuem ação antibiótica ao nível de membranas dos microrganismos, pois apresentam propriedades formadoras de canais e podem permeabilizar a bicamada lipídica (Schröder, 1999);

(2) peptídios catiônicos ricos em prolina, com 2 a 4 kDa, sendo representados pelas apidaecinas, abaecina e drosocina (Papagianni, 2003). Estes são também primariamente ativos contra bactérias gram-negativas, apresentando alguns representantes efetivos contra bactérias gram-positivas (Schröder, 1999).

(3) peptídios ricos em glicina de 8 a 30 kDa, representados pelas dipterocinas, atacinas, sarcotoxina II e coleoptericina (Papagianni, 2003).

(4) defensinas de insetos, compostas de 38 a 43 resíduos de aminoácidos e três ligações dissulfeto, sendo moléculas moderadamente catiônicas e que afetam primariamente bactérias gram-positivas. São expressas constitutivamente em níveis basais ou são produzidas pelos corpos lipídicos de maneira induzida em resposta a ataques de patógenos, e então secretadas na hemolinfa dos insetos (Hoffmann e Hétru, 1992; Schröder, 1999). Como mecanismo de defesa, as defensinas de insetos são capazes de induzir a formação de canais dependentes de voltagem em membranas citoplasmáticas de *Micrococcus luteus*, que levam a um rápido efluxo de potássio e de outros íons (Cociancich *et al.*, 1993).

Sappecinas também inibem canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$ , sugerindo a existência de outras funções envolvendo células hospedeiras, talvez não relacionadas à atividade antibacteriana (Gillespie *et al.*, 1997). Um único inseto é capaz de sintetizar um conjunto de proteínas e peptídios antibacterianos que são secretados na hemolinfa, o que permite um curto período de proteção antes que a nova infecção ocorra.

### **2.1.5 - Peptídios de plantas**

Nos últimos anos, novos peptídios com atividade antimicrobiana têm sido isolados de plantas e, em particular, de sementes (Carvalho *et al.*, 2001). Os peptídios antimicrobianos são considerados de grande importância na defesa de

plantas como parte da barreira constitutiva pré-existente, e também como resposta induzida por infecção (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; 2001).

Os peptídios antimicrobianos vegetais apresentam grande potencial como compostos a serem explorados comercialmente como agentes antimicrobianos naturais, especialmente antifúngicos (Knight *et al.*, 1997).

## **2.2 - Mecanismos de defesa em vegetais**

Nas últimas décadas, muitos esforços têm sido realizados no sentido de se elucidar quais mecanismos de resistência são utilizados pelas plantas para se defenderem ou para evitarem o ataque por parte de seus agressores (Harborne, 1982; Cornelissen e Melchers, 1993).

Diversos mecanismos de defesa são ativados em resposta ao ataque de agressores em plantas denominados defesas induzidas. As plantas possuem também as defesas pré-existentes ou constitutivas que já se encontram na planta antes do ataque do patógeno e fazem parte do seu desenvolvimento normal (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; 2001). Ambas as formas de defesa, induzidas e pré-formadas, podem ainda ser divididas em químicas e físicas. As defesas químicas podem ser de origem não protéica, como os componentes orgânicos: fitoanticipinas e fitoalexinas, tendo como exemplo as saponinas, os glicosídeos cianogênicos, os glicosinolatos e os flavonóides (Mansfield, 1983), e de origem protéica, como as enzimas hidrolíticas (Mauch *et al.* 1988; Gomes *et al.* 1996), dentre outras proteínas (Shewry e Lucas, 1997) e os peptídios antimicrobianos (Almeida *et al.*, 2000).

Várias classes de proteínas têm sido implicadas nos mecanismos de defesa de plantas contra patógenos e insetos, sejam elas induzidas ou constitutivas. A grande maioria atua por detecção direta do patógeno ou herbívoro agressor, exibindo atividades antimicrobianas e/ou anti-insetos (Broekaert *et al.*, 1992; Gomes e Xavier-Filho, 1993; Shewry e Lucas, 1997). As sementes de plantas, por exemplo, apresentam um grande número de proteínas de defesa depositadas durante a sua formação, e que fazem parte do desenvolvimento normal da planta. Dentre elas, encontramos principalmente quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases, lectinas, vicilinas, albuminas 2S e diferentes peptídios

antimicrobianos (Raikhel *et al.*, 1993; Osborn *et al.*, 1995; Kader, 1996; Xavier-Filho, 1996; Shewry e Lucas, 1997; Wang *et al.*, 2001). Peptídios com propriedades antimicrobianas estão presentes em todas as espécies de plantas, podendo ocorrer em todos os órgãos vegetais. A superexpressão de alguns peptídios promove o aumento na tolerância das plantas a patógenos e, ainda, gera patógenos mutantes sensíveis aos peptídios, apresentando virulência significativamente menor nos tecidos de plantas em que os peptídios estão presentes (García-Olmedo *et al.*, 1998, citando vários autores; Schröder, 1999).

### **2.2.1 - Diversidade e classificação dos peptídios de vegetais**

Em função da grande diversidade de peptídios antimicrobianos de origem vegetal, verifica-se que a real função de defesa de um peptídio na planta poderá somente ser demonstrada após avaliação de um conjunto de observações de diversas naturezas, sendo que nenhuma das quais será conclusiva por si só. Alguns critérios a serem observados são a atividade antimicrobiana *in vitro*, a distribuição do peptídio no organismo, a concentração antes e após a infecção, a expressão gênica e correlação entre nível de expressão e controle de sintomas, e diferenças de resistência dos patógenos aos peptídios em relação à virulência. Um progresso considerável tem sido alcançado na identificação de peptídios antimicrobianos em plantas com base nestes critérios (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998).

De acordo com Hancock e colaboradores (1998), os peptídios antimicrobianos de plantas são tipicamente catiônicos, compostos por moléculas anfipáticas que contêm de 12 a 50 resíduos de aminoácidos, com carga líquida positiva variando de +2 a +7 em função de um excesso de aminoácidos básicos. Esses peptídios podem ser produzidos constitutivamente ou induzidos somente após a infecção ou injúria. Em geral, pelo menos 50% dos aminoácidos são hidrofóbicos, um fato refletido na interação dos peptídios com a membrana das bactérias como parte do mecanismo de ação.

Em relação a seu pequeno tamanho e aspectos físico-químicos comuns, os peptídios antimicrobianos catiônicos têm estrutura tridimensional complexa.

Peptídios das classes mais comumente encontrados são formados por associações de folhas  $\beta$ , estabilizadas por duas a quatro ligações dissulfeto, algumas vezes associadas a um domínio  $\alpha$  hélice. Apesar dos peptídios antimicrobianos possuírem grande diversidade estrutural, certamente eles apresentam um padrão estrutural comum (Hancock *et al.*, 1998; Hancock, 2000).

Baseado na homologia da estrutura primária, peptídios antimicrobianos de plantas podem ser classificados em 10 famílias com massas moleculares que variam de 2 a 9 kDa, sendo denominadas: Tioninas, Defensinas, Proteínas de Transferência de Lipídios, Peptídios semelhantes-à-haveína, Peptídios semelhantes-a-nós, MBP1, IbAMP, Snakinas, Sheferdinas e Peptídios macrocíclicos (Broekaert *et al.*, 1997, Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; Garcia-Olmedo *et al.*, 2001). Informações da estrutura tridimensional têm sido obtidas para um ou mais membros dessas famílias (Broekaert *et al.*, 1997).

As Tioninas correspondem ao primeiro grupo de peptídios identificado com atividade antimicrobiana contra patógenos (Fernandez de Caleyra *et al.*, 1972). As Tioninas representam uma família de peptídios antimicrobianos altamente básicos, ricos em cisteína, contendo 45 a 47 resíduos de aminoácidos, que ocorrem em diversas espécies de plantas. Elas podem ser encontradas em vários órgãos de plantas, como em endospermas de sementes, caules, raízes e em folhas quando são atacadas por patógenos (Thevissen *et al.*, 1996). Baseado na estrutura de suas ligações dissulfeto, podem ser classificadas em três grupos: o primeiro grupo, com quatro ligações dissulfeto, que inclui os grupos I e II, o segundo grupo com três ligações dissulfeto (tipos III e IV) e um terceiro grupo contendo duas das ligações dissulfeto que aparecem nos grupos anteriores mais uma nova em posição diferente (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998). As Tioninas são tóxicas para bactérias gram-positivas ou gram-negativas, fungos, leveduras ou diferentes tipos de células de mamíferos (Thevissen *et al.*, 1996; Schröder, 1999). A toxidez ocorre por interação eletrostática das tioninas com fosfolipídios de membrana carregados negativamente, seguindo-se ou a formação de poros ou interações específicas com domínios nas membranas que medeiam a transdução de sinais celulares em eucariotos, gerando a liberação de compostos específicos e a ativação de enzimas específicas e de canais de cálcio (Thevissen *et al.*, 1996; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998).

As proteínas de transferência de lipídios (LTPs) correspondem a uma família de peptídios de 9 kDa, contendo de 90 a 95 resíduos de aminoácidos, e são encontradas em diversos tecidos de muitas espécies de mono e dicotiledôneas. Estão envolvidas em defesa de plantas, mas a princípio foram erroneamente consideradas como transportadores de lipídios entre organelas (Terras *et al.*, 1992; Molina *et al.*, 1993; Segura *et al.*, 1993; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2001).

A proteína haveína é abundante no látex de seringueiras e possui 43 resíduos de aminoácidos. É um peptídio rico em cisteína/glicina, homólogo ao domínio de ligação da quitina de muitas proteínas multidomínios de plantas, e homólogo a outros peptídios de domínio simples que têm atividade antimicrobiana em plantas (Broekaert *et al.*, 1992). Os peptídios antimicrobianos semelhantes-à-haveína, extraídos de pimenta doce, contêm as mesmas quatro ligações dissulfeto presentes na haveína, e apresentam estrutura contendo três folhas  $\beta$  e uma  $\alpha$ -hélice que se liga às segunda e terceira folhas  $\beta$  (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998).

Duas outras famílias de peptídios antimicrobianos contendo quatro ligações dissulfeto foram relatadas: MBP-1, com 33 resíduos de aminoácidos e extraído do milho, e o grupo de peptídios de 20 resíduos de aminoácidos, Ib-AMPs, isolados de sementes de *Impatiens balsamina* (Tailor *et al.*, 1997).

Os peptídios antimicrobianos com padrão de enovelamento semelhante-a-nós (Knotin-like), denominadas knotinas, possuem de 36 a 37 resíduos de aminoácidos e três ligações dissulfeto, e apresentam homologia com os peptídios antimicrobianos semelhantes-à-haveína (Broekaert *et al.*, 1990). Ambas as famílias de peptídios inibem uma ampla gama de fungos e bactérias gram-positivas *in vitro* e suas atividades são revertidas por cátions bivalentes (Cammue *et al.*, 1992).

Uma nova família de peptídios antimicrobianos contendo seis ligações dissulfeto foi denominada *snakinas* (St-SN1) (Segura *et al.*, 1999). Um peptídio com 63 resíduos de aminoácidos, ativo contra fungos e bactérias gram-positivas e gram-negativas em concentrações inferiores a 10  $\mu$ M, foi extraído de batatas e parece ter distribuição ubíqua, embora somente este membro da família tenha sido até então caracterizado.

As defensinas foram inicialmente caracterizadas em insetos e mamíferos e, mais recentemente, em plantas (Broekaert *et al.*, 1995; García-Olmedo *et al.*, 1998). As defensinas de plantas apresentam propriedades estruturais e funcionais semelhantes às observadas em defensinas de insetos e de mamíferos. Estes peptídios apresentam carga líquida positiva, sendo os peptídios antimicrobianos ricos-em-cisteína mais bem caracterizados em plantas (Segura *et al.*, 1998). Em geral as defensinas de plantas possuem de 45 a 54 resíduos de aminoácidos e apresentam clara e limitada conservação na seqüência de aminoácidos de todos os membros desta família, centrando-se em oito resíduos de cisteína (Almeida *et al.*, 2000). Estes peptídios possuem quatro ligações dissulfeto e são enovelados de forma globular, contendo três estruturas folhas  $\beta$  antiparalelas e uma  $\alpha$ -hélice em paralelo às folhas  $\beta$  (Bruix *et al.*, 1993; Thevissen *et al.*, 2000). A estrutura em  $\alpha$ -hélice é conectada por duas ligações dissulfeto à terceira folha  $\beta$ , um motivo estrutural inicialmente conhecido como  $\alpha$ -hélice-estabilizada por cisteínas (Kobayashi *et al.*, 1991), mas atualmente descrito como  $\alpha$ -hélice-folha- $\beta$  estabilizadas por cisteína (Kushmerick *et al.*, 1998), motivo que ocorre freqüentemente nas defensinas de insetos.

Dentre as duas novas famílias de peptídios antimicrobianos mais recentemente descritas, a primeira corresponde às sheferdinas, que são peptídios lineares ricos em glicina/histidina, foram isoladas de raízes de uma planta conhecida como *Shepherd's purse* (*Capsella bursa-pastoris*), possuem de 28 a 38 resíduos de aminoácidos e são ativas contra bactérias e fungos (Park *et al.*, 2000). A segunda família são os peptídios macrocíclicos, purificados de diferentes plantas da família Rubiaceae (café e outras plantas tropicais) durante pesquisas que buscavam componentes anti-HIV, e possuem de 29 a 31 resíduos de aminoácidos, duas ligações dissulfeto e são ativos contra bactérias gram-positivas (Tam *et al.*, 1999).

A Tabela 01 sumariza as classes de peptídios antimicrobianos vegetais descritas e fornece informações das diferentes características estruturais e espectro de ação antimicrobiana.

**Tabela 01** - Famílias de peptídios antimicrobianos vegetais

Família	Número de resíduos	Ligações dissulfeto	Sub-famílias	Atividades
LTPs	90-95	3-4	I-II	Bactéria e fungo
Snakinas	61-70	6	I-III	Bactéria e fungo
Defensinas	45-54	4	I-V	Bactéria e fungo
Tioninas	45-47	3-4	I-V	Bactéria e fungo
Peptídio semelhante a haveína ( <i>Havein-like</i> )	43	4	I	Bactéria Gram (+) e fungo
Peptídio semelhante a nó ( <i>Knotinas</i> )	36-37	3	I	Bactéria Gram (+) e fungo
Sheferdinas	28-38	0 (linear)	I-II	Bactéria e fungo
MBP-1	33	2	I	Bactéria e fungo
Peptídios Macrocíclicos	29-31	3	I-III	Bactéria Gram (+)
Ib-AMPs	20	2	I	Bactéria Gram (+) e fungo

Fonte: Garcia-Olmedo *et al.*, 2001.

### 2.3 - Mecanismos de ação dos peptídios antimicrobianos

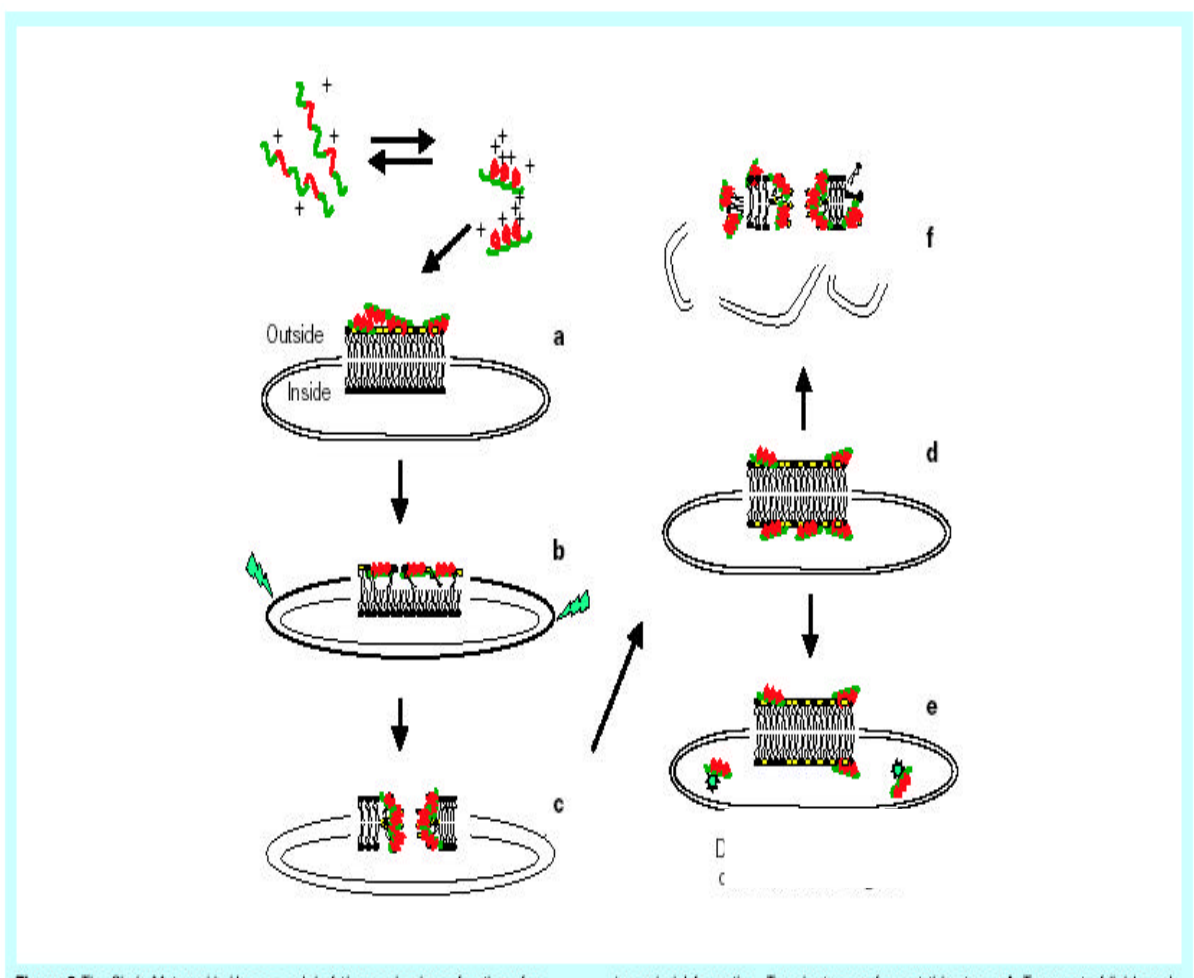
Interações entre peptídios bioativos e membranas celulares é um importante passo na ocorrência de muitos processos celulares (Papo, 2003). Os fatores determinantes dos mecanismos antimicrobianos desses peptídios estão relacionados às características das membranas das células microbianas e à natureza físico-química do peptídio. Acredita-se que a atividade antimicrobiana e a seletividade dos peptídios sejam determinadas pelo modo de interação dessas moléculas com as membranas celulares dos microrganismos (Liang e Kim, 1999).

Os peptídios antimicrobianos são freqüentemente catiônicos, anfipáticos e a maior parte é capaz de destruir as bactérias por permeabilizar sua membrana celular. O modo de ação dos peptídios antimicrobianos catiônicos mostra que estes peptídios agem na membrana do citoplasma, e estes tendem a formar canais (Papagianni, 2003). A carga positiva, presumivelmente, facilita interações com os fosfolipídios de membrana, negativamente carregado e/ou o conteúdo ácido da parede celular de bactérias, enquanto o caráter anfifílico possibilita a permeabilização na membrana (Papagianni, 2003). Esse fato aparentemente

ocorre em função de os peptídios possuírem uma afinidade três vezes maior por essas membranas do que com os cátions bivalentes nativos como  $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{Mg}^{++}$ . Assim, a propriedade de barreira seletiva da membrana é destruída e a célula bacteriana fica exposta à passagem de uma grande variedade de moléculas, incluindo compostos hidrofóbicos, pequenas proteínas e/ou compostos antimicrobianos, e, o mais importante, à importação do próprio peptídio que causou o efeito perturbador no envoltório celular. Esse mecanismo explica como os peptídios catiônicos ligam-se e inibem a endotoxemia e como eles podem ser utilizados sinergisticamente aos antibióticos convencionais (Cristensen *et al.*, 1988; Tejada *et al.*, 1995).

A especificidade na interação dos peptídios com as membranas gera diferenças em sua eficácia. Alguns peptídios são específicos para bactérias gram-positivas porque não possuem a capacidade de criar um sistema de transporte próprio, necessário para a atividade bactericida contra gram-negativas (Cristensen *et al.*, 1988; Tejada *et al.*, 1995). A morte de bactérias gram-positivas ou gram-negativas está ligada à formação de canais na membrana citoplasmática (Liang e Kim, 1999). Os agregados moleculares formam um aglomerado com sua face hidrofóbica voltada para o interior da membrana, e sua face hidrofílica voltada para o meio extracelular e para o interior do citoplasma ou para o espaço interplasmático, formando um canal. Tendo a integridade da membrana destruída, a célula morre (Liang e Kim, 1999, Zasloff, 2002). Alternativamente, os peptídios antimicrobianos podem se ligar a um receptor da membrana, levando a uma perda específica de sua função. Além disso, ao se translocarem através da membrana, essas moléculas podem atuar intracelularmente, impedindo a síntese de metabólitos importantes para o microrganismo. Por atuarem em diferentes compartimentos celulares, esses compostos tornam-se candidatos promissores ao desenvolvimento de drogas importantes no combate a patógenos resistentes aos antibióticos convencionais (Lohner, 2001; Zasloff, 2002) (Figura 01).

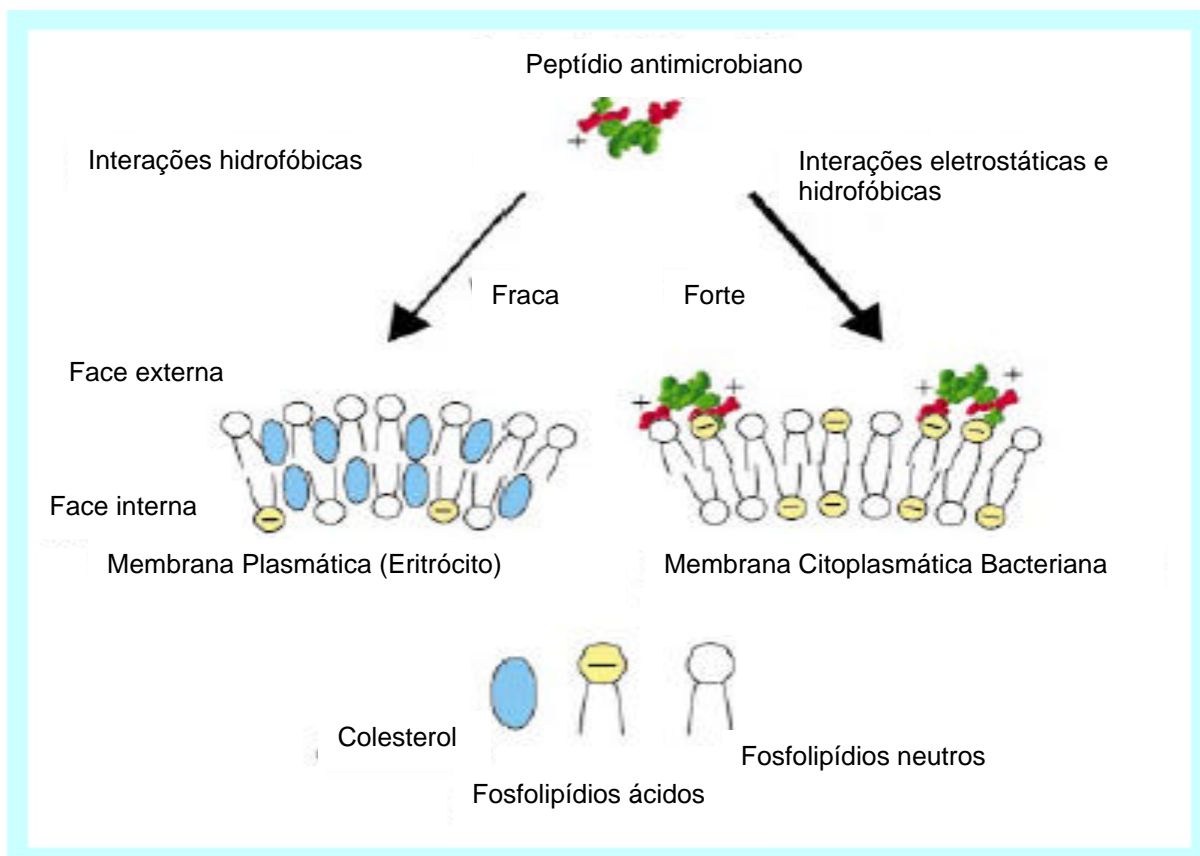
A capacidade de formar canais é favorecida pelo grande potencial da membrana, pelo alto nível de lipídios negativamente carregados, pela ausência de lipídeos catiônicos e colesterol, que são características da célula bacteriana. As células eucarióticas, por outro lado, têm baixo potencial de membrana, altos níveis de colesterol e uma quantidade modesta de lipídeos aniônicos (Figura 02) (Zasloff, 2002), o que torna o peptídio específico para a ação contra procariontes.



**Figura 01** - Modelo de mecanismo de ação de peptídios antimicrobianos (Shai-Matsuzaki-Huang; citado por Zasloff, 2002). a, Aproximação e ligação do peptídio com a membrana externa de uma bactéria; b, Interação e início da inserção do peptídio catiônico na membrana externa de uma bactéria; c, Estágio de formação dos poros e/ou infiltração; d, Transporte de lipídios e peptídios para face interna; e, Difusão dos peptídios até alvo de ação (alguns casos) e, f, Colapso da membrana e destruição da célula alvo. Lipídios com grupos de cabeça carregados negativamente (amarelo) e lipídios neutros (preto).

O mecanismo de ação das defensinas vegetais, bem como de outros peptídios com atividade antimicrobiana, ainda não é completamente entendido, embora vários estudos indiquem que a ação de peptídios ocorre no geral por alteração da permeabilidade de membranas (Boman, 1998; Thevissen *et al.*, 2000).

A interação dos peptídios com os microrganismos é mediada por fosfoglicerídeos de membranas como fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina. Muitos estudos têm sido realizados para tentar entender o mecanismo de ação



**Figura 02** - O alvo nas membranas dos peptídios antimicrobianos e as bases da especificidade (Zaslouff, 2002) .

das defensinas de plantas. Thevissen e colaboradores (1996 e 2000) mostraram que a defensina Dm-AMP1 de semente de dália (*Dahlia merckii*) induz uma série de respostas relativamente rápidas nas membranas de fungos, incluindo um aumento no efluxo de  $K^+$ , no influxo de  $Ca^{2+}$ , no influxo de pigmentos fluorescentes e mudanças no potencial de membrana.

O mecanismo de ação sugerido por Thevissen e colaboradores (2000) mostra que o primeiro passo necessário para a inibição do crescimento dos fungos deverá ser a ligação das defensinas das plantas a sítios na membrana plasmática das hifas dos fungos. Interações com esses sítios de ligação deverão ser capazes de inserir as defensinas de plantas na membrana plasmática, afetando então a estrutura da membrana e a permeabilidade a certos solutos, como  $Ca^{2+}$  e  $K^+$ , alguns dos quais têm papel importante no crescimento e desenvolvimento dos fungos.

## 2.4 - Aplicações e aspectos gerais dos peptídios antimicrobianos

Os peptídios antimicrobianos apresentam um potencial considerável para uma variedade de aplicações terapêuticas para diferentes organismos (Aumelas *et al.*, 1996). Uma das principais aplicações destes peptídios antimicrobianos é que estes compostos, em geral, não apresentam problema de resistência microbiana se comparados a vários medicamentos existentes. As diferentes estruturas de peptídios antimicrobianos indicam a possibilidade de que alguns destes compostos poderão ser usados como agente antimicrobiano, à semelhança dos antibióticos disponíveis comercialmente. Entretanto, pouco se conhece sobre a forma de penetração, toxidez potencial e custo de produção (Ganz e Lehrer, 1999). Apesar de não se conhecer claramente os mecanismos de ação, os peptídios têm mostrado expressiva atividade *in vitro* contra microrganismos resistentes a antibióticos convencionais. Em torno de 700 moléculas de peptídios são conhecidas, enquanto milhares de variantes sintéticas poderiam ser quimicamente produzidos (Hancock *et al.*, 2002).

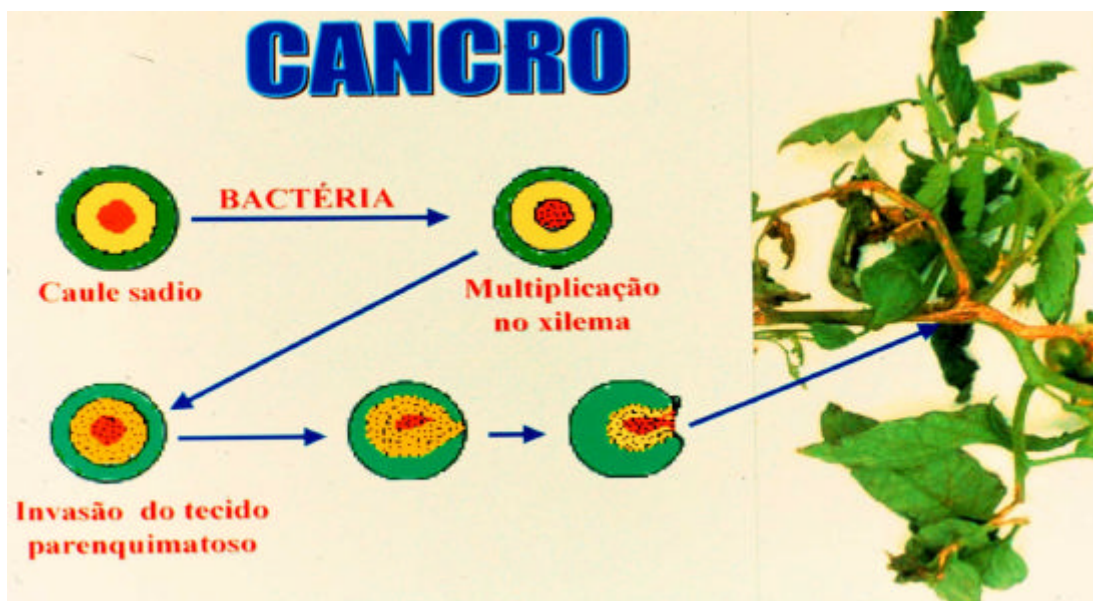
Os mais potentes peptídios antimicrobianos identificados, que são capazes de eliminar bactérias susceptíveis *in vitro*, necessitam de concentrações que variam de 0,25 a 0,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Apesar de existirem antibióticos mais potentes, os peptídios possuem vantagens que incluem a habilidade de eliminar células alvo rapidamente enquanto que antibióticos convencionais possuem amplo espectro de ação e a atividade contra alguns patógenos resistentes em clínica (Hancock *et al.*, 1998).

Fungos fitopatogênicos de importância agrônômica são considerados um fator limitante na eficácia e na vida útil das mais variadas estratégias de controle de doenças (Heaney *et al.*, 1994). Muitos gêneros tais como *Aspergillus*, *Botrytis*, *Venturia*, *Ustilago*, *Marnaporte*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Cercospora*, *Cladosporium* e *Penicillium* têm desenvolvido estratégias de resistência contra os fungicidas (Steffens *et al.*, 1996). Nos últimos anos, tem-se constatado que mesmo fungicidas de amplo espectro de ação, como o Benomyl, tornaram-se alvo de resistência (Tanaka *et al.*, 1997).

Para este fim, peptídios antimicrobianos vegetais apresentam grande potencial como compostos naturais a serem explorados comercialmente, já que apresentam no geral baixa toxicidade para humano e para a vida silvestre, baixo impacto ambiental, baixo nível de resíduos nos alimentos e permitem o manejo integrado de pragas (Knight *et al.*, 1997).

Nos últimos anos, estima-se que perdas de alimento e de lucros após ação de fitopatógeno sejam de aproximadamente 20% do total mundial, mesmo com o uso dos fungicidas comerciais disponíveis (Aumelas *et al.*, 1996). Diante destes dados, o uso de novas tecnologias para o desenvolvimento de drogas mais eficazes constitui uma estratégia promissora no campo da biotecnologia, uma vez que possibilitará iniciativa de prospecção de novas classes de moléculas naturais e/ou sintéticas, capazes de neutralizar ou de danificar o patógeno-alvo, ao invés de inviabilizá-lo geneticamente, inibindo assim o desenvolvimento da resistência (Heinemann *et al.*, 2000).

As culturas comerciais de tomate, em especial, são altamente susceptíveis ao ataque por diversos microrganismos de difícil controle, causando prejuízos significativos na agricultura (Aumelas *et al.*, 1996), o que poderia ser controlado pelo uso de peptídios antimicrobianos. A bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pode ser considerada um patógeno causador de uma das doenças que mais lesa os tomateiros, causando considerável prejuízo econômico aos agricultores. Esta doença causa cancro (lesões) e murchadeira em toda a extensão da planta (Gartemann, 2003). O sintoma de cancro tem aspecto de lesões alongadas no caule, profundas, lembrando uma rachadura. Ele é originado de uma infecção sistêmica em decorrência da invasão da bactéria na planta, que passa a se multiplicar nos feixes vasculares (Romeiro e Neto, 2001) (Figura 03). Outra bactéria de importância comercial é a *Ralstonia solanacearum*, que causa murchadeira (Williams, 2003). O tomateiro afetado apresenta colapso dos tecidos que parece afetar a funcionalidade dos vasos em se tratando de transporte, e isso, aparentemente, contribui para murcha (Romeiro e Neto, 2001) (Figura 04).



**Figura 3** - Sintoma de cancro: Esquerda, gênese do sintoma; Direita, cancro do tomateiro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). Adaptado de Romeiro e Neto, 2001.



**Figura 4** - Murcha bacteriana do tomateiro, incitada por *Ralstonia solanacearum*. Adaptado de Romeiro e Neto, 2001.

A semente da planta é, em geral, o órgão responsável pela sua propagação e dispersão, e por isso carrega toda a informação genética necessária para a formação de um novo indivíduo (Xavier-Filho, 1993). Em virtude desta importância, acredita-se que o período de germinação seja muito crítico, e que todos os mecanismos de defesa das plantas em germinação estejam bastante ativos para assegurar sua propagação, incluindo uma importante ativação/expressão de peptídios antimicrobianos. Estas características, tornam oportuna a busca por peptídios antimicrobianos em sementes durante a germinação.

Considerando a importância comercial e nutricional do tomate, este trabalho teve como objetivo a purificação e a identificação de diferentes peptídios de sintetizados durante a germinação de sementes de soja, que tenham atividade contra importantes patógenos de plantas de tomate. O objetivo maior corresponde à utilização desses peptídios como princípios ativos no desenvolvimento de defensivos naturais para tomateiros, soja e outras plantas, e ainda agentes antimicrobianos para animais nas indústrias farmacêuticas e veterinária.

### 3 – OBJETIVOS

Peptídios antimicrobianos vegetais vêm sendo apontados como agentes de defesa promissores para a identificação de princípios ativos para a produção comercial de defensivos agrícolas ou agentes antimicrobianos para as indústrias farmacêutica e veterinária. Esse trabalho teve como objetivo maior identificar e purificar peptídios antimicrobianos sintetizados por sementes de soja durante a germinação, que serão posteriormente avaliados como agentes para a defesa de plantas ou de animais.

As estratégias utilizadas envolvem o uso de técnicas de fracionamento salino, por temperatura ou cromatográficas, acompanhadas por avaliação com SDS-PAGE-Tricina, a avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídios purificados contra as bactérias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Ralstonia solanacearum*, a determinação de massas moleculares dos peptídios purificados pela técnica espectrométrica por *Electron-spray*, visando para sua caracterização estrutural para uso posterior destes compostos como defensivos agrícolas naturais e agentes antimicrobianos para as indústrias farmacêutica e veterinária.

## **4 – METODOLOGIA**

### **4.1 - Infra-estrutura**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas e no Laboratório de Purificação e Expressão de Proteínas, ambos no BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa (UFV). As cromatografias de fase reversa foram realizadas no Laboratório de Genética do Departamento de Microbiologia, na UFV, e no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas, no Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). As análises de espectrometria de massa dos peptídios foram também realizadas no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas, na UFMG.

### **4.2 – Materiais**

Para a realização dos experimentos, foram utilizados reagentes comuns como bases, sais, ácidos, álcoois, dentre outros, e alguns reagentes específicos, como EDTA, MES, AgNO<sub>3</sub>, tiouréia, reagentes para eletroforese, e outros, que foram adquiridos de empresas como Sigma Chemical Co, MERCK, GIBCO BRL, VETEC, Grupo Química, Amersham Pharmacia Biotec e BIORAD, ou outras de qualidade equivalente.

O padrão de massa molecular de ampla faixa, para eletroforese, foi adquirido da BIORAD ou da Amersham Pharmacia Biotec.

Membranas de 0,45 µm e de 0,22 µm de poro, utilizadas para filtrar soluções-tampão para cromatografias e amostras a serem aplicadas nas colunas cromatográficas, respectivamente, foram adquiridas da Millipore Corporation ou de empresas com qualidade equivalente. Foram utilizadas ainda membranas de diálise com volume de exclusão 1.000 Da, adquiridas da Sigma Chemical Co.

As resinas cromatográficas, DEAE-Sepharose e CM-Sepharose, foram adquiridas da Amersham Pharmacia Biotec. A coluna usada para a cromatografia de fase reversa foi uma C<sub>18</sub> (Shim-pack CLC-ODS-M) da Shimadzu.

### **4.3 – Microrganismos**

Os microrganismos utilizados para os testes de inibição de fitopatógenos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Reginaldo da Silva Romeiro, coordenador do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico, do Departamento de Fitopatologia, na UFV. Foram utilizadas duas bactérias-teste, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Ralstonia solanacearum*, como representantes de bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente.

### **4.4 - Material vegetal: condições de germinação, coleta e armazenamento da soja**

Sementes de soja da variedade UFV16 foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Maurílio Moreira Alves, do Programa de Melhoramento de Soja, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na UFV. As sementes de soja foram germinadas em papel Germtest, sendo este umedecido com a quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes o seu peso. O papel contendo as sementes foi enrolado e levado para a câmara de germinação a 28°C, localizada na Casa de Apoio do BIOAGRO, na UFV. As sementes foram coletadas após 24, 48, 72 e 96 h de germinação, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C, para serem utilizadas posteriormente como fonte de peptídios, visando identificar o tempo de germinação com maior síntese dos peptídios de interesse. Também foram utilizadas sementes não germinadas de soja da mesma variedade.

### **4.5 - Extração e purificação dos peptídios de sementes maduras e germinadas de soja**

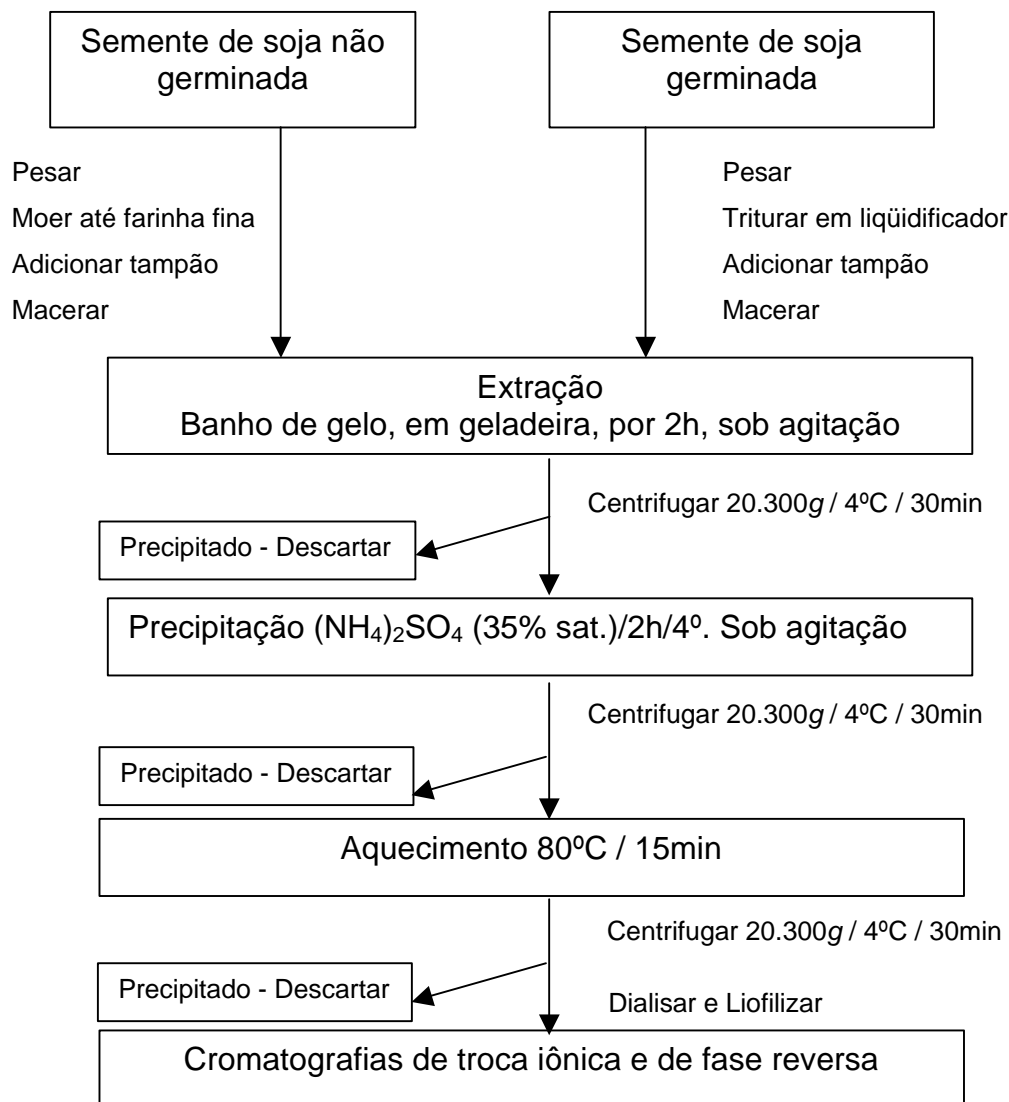
A extração dos peptídios de sementes germinadas de soja foi realizada conforme descrito por Terras e colaboradores (1992) e Segura e colaboradores (1998), com modificações. As sementes germinadas por 24, 48, 72 e 96 h foram

pesadas, transferidas para liquidificador, trituradas em nitrogênio líquido e adicionadas de 2,5 volumes de tampão de extração Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, contendo EDTA 10 mM, PMSF 1 mM e benzamidina 1 mM.

Sementes não germinadas de soja foram extraídas conforme descrito por Terras e colaboradores (1992). As sementes foram moídas em moinho para alimentos até a formação de uma farinha de fina granulação, seguindo-se a adição do tampão de extração, pH 7,4 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 15 mM; KCl, 0,1M; EDTA, 2 mM; tiouréia, 2 mM; PMSF, 1 mM e benzamidina, 1 mM) na proporção de 1:5 (gramas semente : mL tampão).

Os homogenatos obtidos de ambos os processos foram agitados por 2h a 4°C, centrifugados a 20.300g e 4°C, em centrífuga refrigerada Beckman Avanti 30. Os sobrenadantes obtidos foram precipitados com 35% de saturação de sulfato de amônio sólido por 2 h. Após centrifugação, o sobrenadante resultante foi aquecido a 80°C por 15 min para a precipitação diferencial de proteínas e, então, novamente centrifugado nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram, a seguir, liofilizados em equipamento modelo Super Modulyo 501, marca Edwards, para redução do volume, ressuspensos em água deionizada e dessalinizados por diálise em membrana de exclusão 1000 Da.

Os processos de extração das sementes não germinadas e germinadas estão resumidos no fluxograma a seguir (Figura 5).



**Figura 05** - Fluxograma dos procedimentos utilizados na purificação dos peptídios presentes nas sementes não germinadas e germinadas de soja.

#### 4.6 - Cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sepharose

Os extratos protéicos de sementes de soja germinadas ou não, obtidos após o aquecimento seletivo, foram dialisados, novamente liofilizados, ressuspensos em água deionizada - Milli Q, filtrados em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  e utilizados como amostra na troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose CL-6B, com a capacidade iônica 0,130 - 0,17  $\text{mmol/mL (NaCl).mL}^{-1}$  e capacidade dinâmica de 120  $\text{mg HSAb.mL}^{-1}$  gel (Pharmacia Biotech), em equipamento tipo

FPLC, modelo *Biologic Workstation - Biologic Controller*, marca BIORAD. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, e eluída isocraticamente ao fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, sendo a presença de proteínas no eluato monitorada pela A<sub>280</sub>. Para cada extrato protéico, foram realizadas três corridas cromatográficas. A fração protéica não ligada à coluna foi eluída em tampão de equilíbrio e correspondeu às proteínas básicas das sementes que contêm os peptídios catiônicos de interesse. As proteínas ligadas à coluna foram eluídas no mesmo tampão adicionado de 1 M de NaCl, representando a fração de proteínas aniônicas, que estão sendo reservadas para posterior avaliação. Foram coletadas frações de 1,0 mL, em coletor de frações do tipo 2128 da BIORAD.

As frações protéicas não ligadas à coluna foram reunidas formando um *pool*, que foi liofilizado e ressuspensos em água deionizada - Milli Q, dessalinizado em membrana de 1.000 Da e novamente liofilizado.

#### **4.7 - Cromatografia de troca catiônica em CM-Sepharose**

Com o objetivo de separar grupos de proteínas catiônicas, o *pool* de proteínas básicas obtido da cromatografia de troca aniônica foi filtrado em membrana de 0,22 µm e 6% do volume total (250 µL) do *pool* foram submetidos à cromatografia de troca catiônica em coluna CM-Sepharose FF, com capacidade iônica de 0,09-0,13 mmol.mL<sup>-1</sup> (Na).mL<sup>-1</sup> e capacidade dinâmica de 50 mg RNase.mL<sup>-1</sup> gel (Pharmacia Biotec). A coluna foi equilibrada com tampão MES 25 mM, pH 6,0. As proteínas de interesse, que representam a fração ligada à coluna, foram eluídas ao fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, em um gradiente descontínuo de NaCl (0 a 1 M), monitoradas automaticamente pelos valores de A<sub>280</sub> em equipamento do tipo FPLC. Foram coletadas frações de 1,4 mL.

#### **4.8 - Cromatografia de fase reversa em Coluna C<sub>18</sub>**

As frações ricas em peptídios básicos, eluídas da cromatografia de troca aniônica e de troca catiônica, foram aplicadas em uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub>-Shim Pack, CLC-ODS, 25 cm, previamente equilibrada na solução A, ao fluxo constante de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e à temperatura ambiente, em equipamento HPLC, tipo

LC-10i, marca Shimadzu. As proteínas foram separadas em gradiente descontínuo de acetonitrila, sendo a solução A (solução de equilíbrio) formada por TFA 0,1% e a solução B, por TFA 0,1% e acetonitrila 80%. A eluição dos peptídios na coluna foi acompanhada automaticamente pelos valores de  $A_{214}$  e  $A_{280}$  e as frações peptídicas obtidas foram liofilizadas e utilizadas para os ensaios de atividade antimicrobiana contra fitopatógenos e para determinação das massas moleculares.

#### 4.9 - Testes de inibição dos patógenos

A avaliação da inibição de bactérias fitopatogênicas em presença dos peptídios parcialmente purificados ou purificados foi determinada pelo Teste de Leitura de Microplacas, proposto por Broekaert e colaboradores (1990) e desenvolvido por Terras e colaboradores (1992), utilizando microespectrofotometria. A partir do estoque de glicerol, as bactérias foram preparadas em câmaras de cultivo, utilizando-se meio de cultivo LB líquido, a 28°C, por períodos adequados. Culturas em meio líquido das bactérias, com a  $A_{560}$  entre 1,0 e 1,2, foram utilizadas nos testes de inibição dos patógenos (Broekaert *et al.*, 1990, desenvolvido por Terras *et al.*, 1992).

As bactérias fitopatogênicas testadas, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (gram-positiva) e *Ralstonia solanacearum* (gram-negativa), foram cultivadas em microplacas de 96 poços, de fundo plano, estéreis, em temperatura de 28°C. A cada poço da microplaca, foram adicionados 50 µL de meio de cultivo concentrado (2X), 10 µL de uma suspensão de bactéria e volumes variáveis (10 a 40µL) dos peptídios a serem testados e quando necessário o volume final de 100 µL foi completado com água Milli Q. A absorvância a 560 nm foi determinada em leitor de microplacas modelo Titertek Multiskan Plus MKII, marca Uniscience do Brasil, no início do cultivo (tempo zero) e em períodos de incubação pré-definidos, até 36 h, para as duas bactérias, traçando-se as curvas de crescimento de cada bactéria.

A inibição foi determinada pela diferença entre as curvas de crescimento em presença e em ausência dos peptídios, observando-se a curva de crescimento após atingir cerca de duas horas de parada de crescimento. Nos ensaios, o

controle negativo correspondeu ao cultivo das bactérias na ausência de peptídios (90  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo 1X e 10  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de bactérias), e o controle interno correspondeu ao cultivo na ausência de bactéria e peptídios (100  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo 1X). Todas as culturas foram preparadas e monitoradas sob as mesmas condições anteriores. Foram feitas duplicatas ou triplicatas dos ensaios, de acordo com a quantidade de amostras disponíveis.

## **4.10 - Caracterização dos peptídios**

### **4.10.1 – Determinação da massa molecular por espectrometria de massa**

As análises de espectrometria de massa foram realizadas no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas, no ICB/UFMG, pelo Prof. Adriano Monteiro de Castro Pimenta.

As frações correspondentes a cada pico eluído da cromatografia de fase reversa, contendo os peptídios básicos, foram concentradas, ressuspendidas em 50  $\mu\text{L}$  de TFA 0,1% e a amostra foi aplicada, via *loop* (10  $\mu\text{L}$ ), em um espectrômetro de massa do tipo *Electron-spray*, modelo Quadrupole-TOF (Q-TOF), marca Micromass®.

### **4.10.2 - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em presença de tricina (SDS -Tricina-Page)**

A eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE) foi desenvolvida segundo Judd (1994), em um gel de três fases, composto por gel de concentração, gel intermediário e gel de separação.

Para os géis intermediário e de separação, utilizou-se uma solução 49,5% T (p/v) e 3,0% C (p/p), a partir da solução acrilamida : N,N'-bis-metileno acrilamida (48,0 : 1,5). Para os gel de concentração, utilizou-se uma solução 30,8% T (p/v) e

2,6% C (p/p), a partir da solução acrilamida : N,N'-bis-metileno acrilamida (30,0 : 0,8). Os géis foram preparados entre placas de vidro de 7 x 10 cm, com espaçadores de 0,75 mm de espessura, em um sistema para eletroforese vertical em mini-géis, modelo MiniProtean II Cell, marca BIORAD.

O gel de separação foi preparado a 16,5% T, em Tris-HCl 1 M, pH 8,9, e 0,1% de SDS. O gel intermediário foi preparado a 10,0% T, em Tris-HCl 1 M, pH 8,9, com 0,1% de SDS. O gel de concentração foi preparado a 5,0% T, em Tris-HCl 0,13 M, pH 6,8. O tampão de amostra (2X) consistia de 2% de SDS, 10% de sacarose, 0,025% de azul de bromofenol e 0,1 M de Tris-HCl, pH 6,8, adicionado de 20% de  $\beta$ -mercaptoetanol no momento do uso. As frações protéicas obtidas durante a purificação foram dialisadas, liofilizadas e ressuspendidas em tampão de amostra, submetidas à agitação contínua em agitador tipo vortex por 1 min, aquecidas por 4 min a 100 °C, e então aplicadas no gel.

Os tampões de corrida utilizados foram: tampão do catodo, composto de 0,1 M de Tris-HCl, 0,1M de Tricina e 0,1% de SDS (não ajustar o pH, que deve estar em aproximadamente 8,25); tampão do anodo, composto de 0,2 M de Tris-HCl, pH 8,9 (ajustado com HCl). As corridas eletroforéticas se desenvolveram por cerca de 4,5 h; a 100 V por 15 min (gel de concentração), 80 V por 30 min (gel intermediário) e 60 V (gel de separação) até completar a corrida.

O marcador de massa molecular de ampla faixa foi utilizado, composto de (Da): albumina sérica (66.200), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (31.000), inibidor de tripsina (21.500), lisozima (14.400) e aprotinina (6.500).

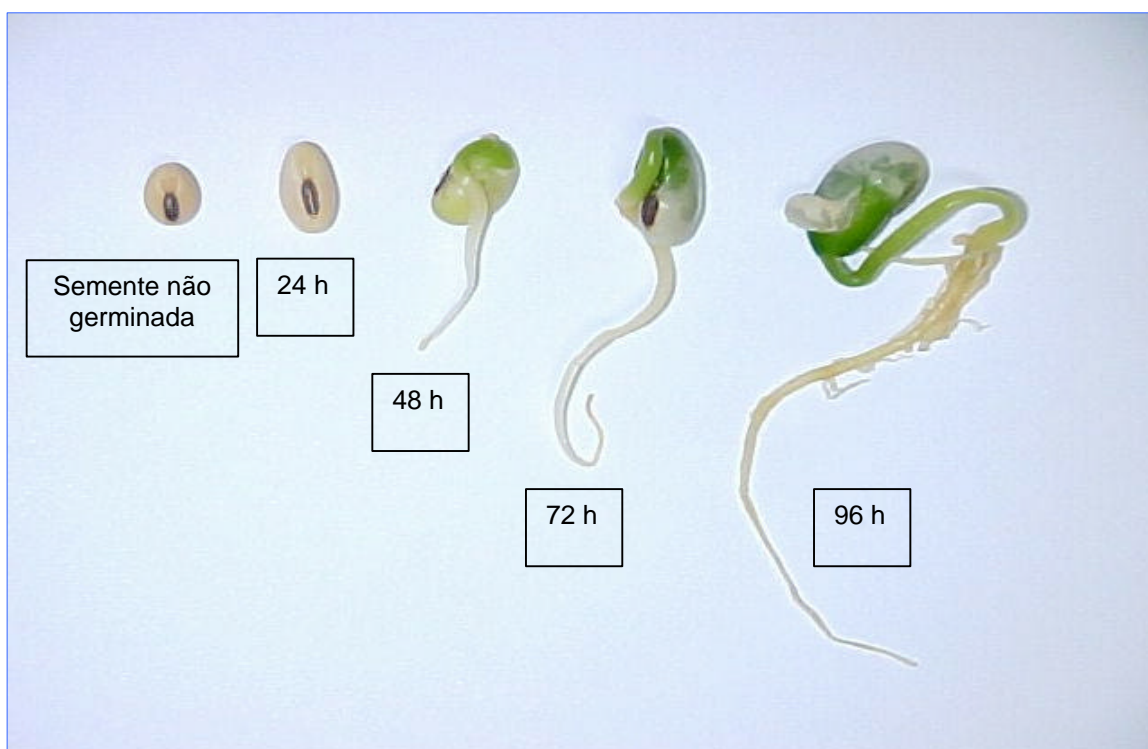
Os géis foram revelados pelo método da prata, baseado na metodologia fornecida pela Pharmacia-Biotech (2000), ou pelo método do Coomassie Blue (Meyer e Lamberts, 1965), de acordo com a quantidade de peptídio/proteína no gel.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Identificação de peptídios sintetizados durante a germinação de sementes de soja quando comparadas com sementes não germinadas.

O processo de extração e de purificação dos peptídios antimicrobianos de sementes germinadas e não germinadas de soja, foram realizados conforme item 4.5, e permitiu a obtenção de formas peptídicas sintetizadas nas sementes germinadas. Extratos de sementes não germinadas de soja foram obtidos e utilizados como referência comparativa em todas etapas de purificação. Apesar de os tampões de extração terem sido diferentes, os perfis cromatográficos obtidos para as sementes não germinadas e germinadas foram essencialmente semelhantes, exceto para o tempo de 48 horas em que se observou a diferença mais expressiva nos picos protéicos obtidos. Assim, a análise comparativa teve como objetivo avaliar e identificar as diferenças na síntese peptídica que ocorrem durante os diferentes períodos de germinação das sementes, sendo que o tempo de germinação de 48 h foi selecionado para as etapas posteriores de purificação e caracterização dessas moléculas.

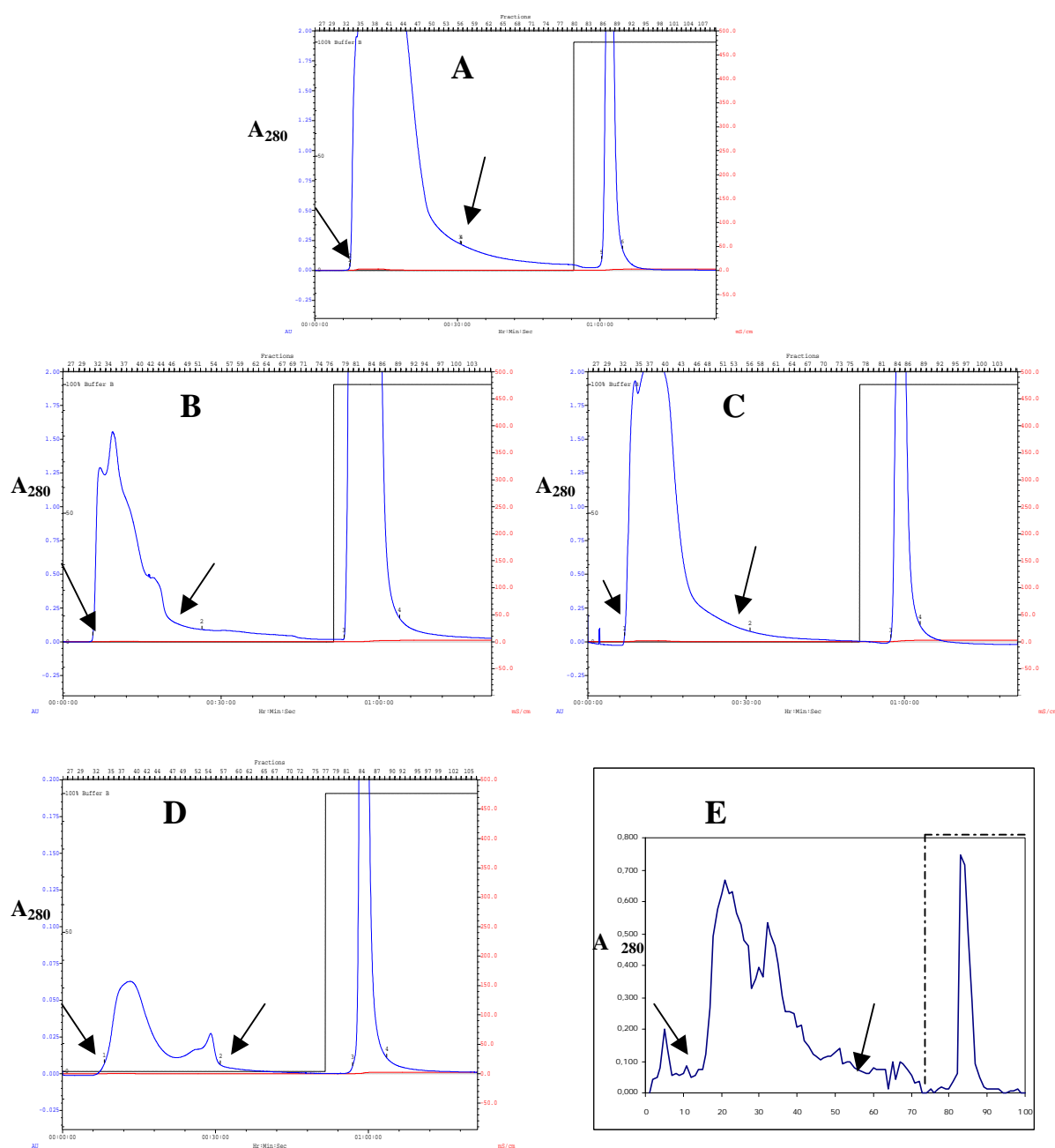
Resultados anteriores obtidos no laboratório indicaram que os peptídios de interesse estão presentes em baixa concentração nas sementes de soja. Assim, cerca de 300 sementes foram germinadas para cada tempo (conforme item 4.4), e os pesos das sementes germinadas por 24, 48, 72 e 96 h foram 100,44; 120,85; 135,20 e 156,48 g, respectivamente. A análise visual mostrou que no tempo de 24 h ocorreu o aumento do volume das sementes, em 48 h observou-se uma pequena radícula, e em 96 h eram visíveis pequenas raízes laterais (Figura 06). A seguir, procedeu-se às extrações para as sementes não germinadas e germinadas por diferentes tempos (conforme descritos no item 4.5). Todos os extratos brutos obtidos foram submetidos à precipitação com sulfato de amônio e ao aquecimento seletivo, seguindo-se diálises.



**Figura 06** – Sementes de soja - Visualização da semente não germinada e sementes germinadas por períodos de 24, 48, 72, e 96 h.

Os dialisados obtidos das sementes não germinadas e germinadas após as etapas iniciais da purificação foram submetidos a cromatografias de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose. Por avaliação da  $A_{280}$ , foram recuperadas as frações de proteínas que não se ligaram na coluna, que correspondem às proteínas de caráter básico e neutro, e que foram reunidas formando um *pool* catiônico para cada extração inicial.

A análise dos cromatogramas (Figura 07) mostrou que os extratos de sementes não germinadas e germinadas por 48h (Figura 07-C) e 96 h (Figura 07-E) apresentam quantidades visualmente maiores de proteínas catiônicas do que aniônicas, o que não foi observado para os demais tempos de germinação (24 e 72 h, Figuras 07-B e 07-D, respectivamente). Este fato sugere que conjuntos diferentes de proteínas e/ou peptídios são sintetizados ao longo das primeiras 96 h de germinação, o que está de acordo com a literatura, já que um aumento de 30% de defensinas é relatado durante a germinação de sementes de rabanetes (Terras *et al.*, 1995). Sabendo-se que muitos peptídios antimicrobianos vegetais

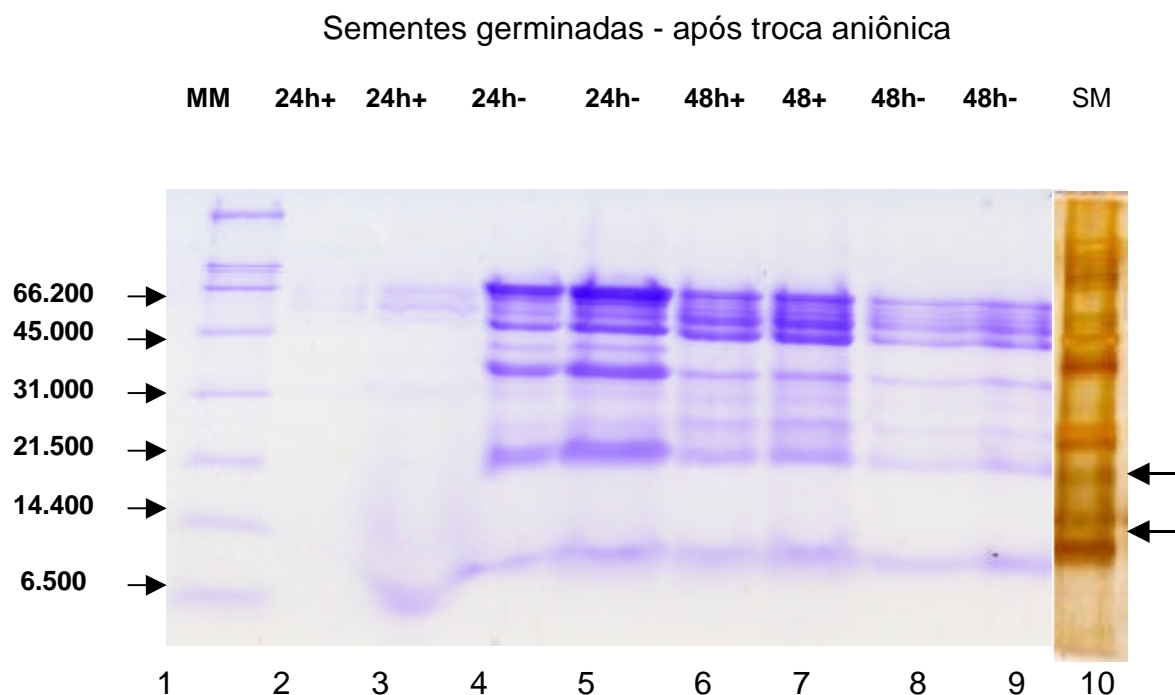


**Figura 07** – Cromatografias de troca aniônica (tipo FPLC) em coluna DEAE-Sephrose (8,0 mL) dos extratos de sementes de soja da variedade UFV 16, precipitados com sulfato de amônio (35% sat.) e aquecidos a 80 °C / 15 min. A coluna foi equilibrada no tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, e as proteínas foram eluídas no mesmo tampão em ausência e em presença de 1 M de NaCl (linha pontilhada). Foram coletadas frações de 1,0 mL a um fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. Os pool de proteínas básicas estão indicados entre as setas. (A) Sementes não germinadas (frações 34 a 54); Sementes germinadas por (B) 24 h (frações 29 a 49); (C) 48 h (frações 32 a 56); (D) 72 h (frações 33 a 54) e (E) 96 h (frações 19 a 58).

descritos apresentam caráter básico (Hancock *et al.*, 1998), sementes germinadas por 48 h podem corresponder à melhor condição para fornecer os peptídios de interesse nesse trabalho. Ainda, o tempo de 48 h de germinação foi considerado mais adequado do que o de 96 h, pois as fases iniciais de eclosão da semente e formação da radícula, com exposição ao solo de tecidos internos da semente (Figura 06), são bastante susceptíveis a ataques por patógenos na fase inicial da germinação (Cots e Widmer, 1999). Outras proteínas envolvidas em processos diversos, como transporte de nutrientes, mobilização de reservas lipídicas, formação de tecidos, dentre outros, aparecerão em maior quantidade em 96 h do que em 48 h (Cots e Widmer, 1999), quando as raízes já estão presentes. Assim as sementes germinadas por 48 h mostram-se mais adequadas como material fonte para a análise dos peptídios catiônicos de interesse.

A análise das separações por SDS-Tricina-Page das frações catiônicas e aniônicas obtidas das sementes germinadas por 24 e 48h (Figura 08) mostrou que, em todas as frações analisadas, peptídios catiônicos ou aniônicos com massas moleculares inferiores a 14 kDa estavam presentes. O extrato de sementes germinadas por 48 h apresentou uma região com bandas intensas na região de peptídios catiônicos (canaletas 6 e 7), o que foi menos evidente para os extratos de sementes germinadas por 24 h (canaletas 2 a 5). Proteínas aniônicas foram sintetizadas em maior concentração no tempo de germinação de 24 h (mesmo estando diluído 20X em relação a 48h) quando comparado com 48 h (Figura 08, canaletas 4, 5, 8 e 9), o que pode ser também observado pelos cromatogramas (Figuras 07 B e C), que indicaram menor quantidade de proteínas no *pool* aniônico das sementes germinadas por 48 h em relação ao *pool* catiônico, o que não ocorreu para o tempo de germinação de 24 h. A fração aniônica de sementes germinadas por 24 h pode apresentar atividade antimicrobiana satisfatória já que peptídios aniônicos vêm sendo recentemente descritos como antimicrobianos (Kalfa *et al.*, 1999; Lai *et al.*, 2002), e resultados obtidos em nosso laboratório para outras plantas indicaram atividade antimicrobiana em frações aniônicas. Porém esses ensaios estão além do escopo deste trabalho.

Deve-se observar que as etapas iniciais da purificação, a precipitação por sal e o aquecimento seletivo, têm o objetivo de favorecer o enriquecimento e a recuperação de peptídios, já que estes são no geral resistentes ao aquecimento



**Figura 08** – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16,5% T) em presença de Tricina dos *pools* formados pelas frações eluídas da cromatografia de troca aniônica (TA) de extratos de sementes germinadas por 24 e 48 h, após aquecimento seletivo. Foram avaliadas duas concentrações dos *pools* catiônicos (+) e aniônicos (-) recuperados da TA, para cada tempo de germinação: 24 h + (0,6 e 1,2  $\mu\text{L}$ ) 24 h -, 3 e 6  $\mu\text{L}$  (diluído 20X em relação a 48h -); 48 h + (0,6 e 1,2  $\mu\text{L}$ ) e 48 h - , 3 e 6  $\mu\text{L}$ , e também o extrato de semente não germinada após aquecimento (SM). O gel foi revelado pela técnica do Coomassie blue, exceto para SM, que foi pela técnica da prata. O padrão de massa molecular de ampla faixa (MM) foi utilizado.

seletivo em função da presença de grande número de pontes dissulfeto nas moléculas (Broekaert *et al.* 1997). A seleção de peptídios resistentes a condições adversas, como aquecimento a 80°C por 15 min, ou concentrações medianas de acetonitrila (20 a 40 % v/v), mostra-se importante já que o objetivo primordial do trabalho é identificar princípios ativos peptídicos, ou análogos, para posterior desenvolvimento de agentes de defesa para uso comercial. Eletroforese utilizando os *pools* catiônicos e aniônicos das sementes germinadas por 72 e 96 h (dados não mostrados) foram realizadas, mostrando também variações nas concentrações e tipos de proteínas presentes nos diferentes tempos de germinação.

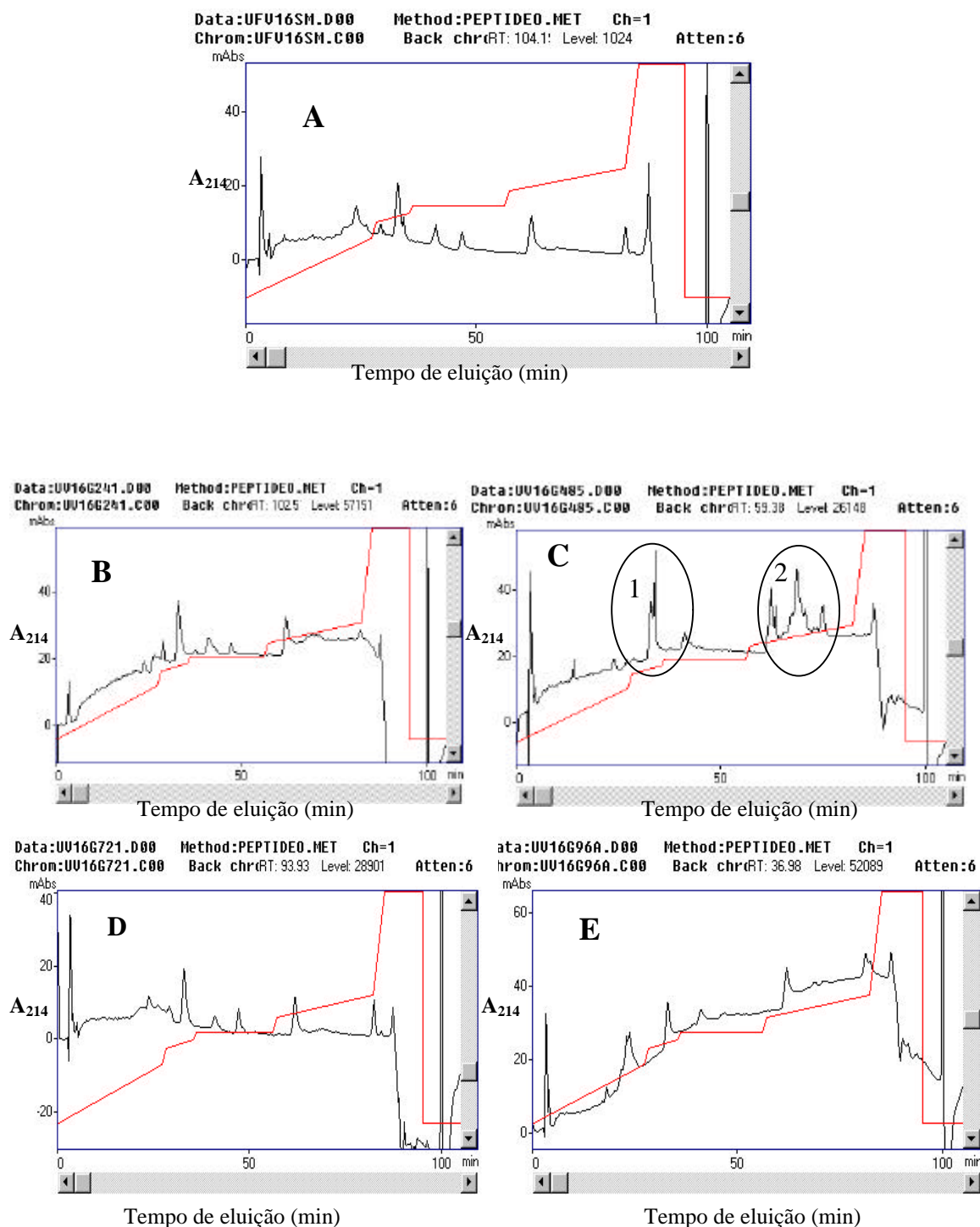
Os cinco *pools* enriquecidos com as proteínas básicas, obtidos das cromatografias de troca aniônica (Figura 07), foram liofilizados e utilizados como amostra em cromatografias de fase reversa (RP-HPLC) utilizando-se a coluna C<sub>18</sub>, visando identificar diferentes frações peptídicas sintetizadas durante a germinação (Figura 09). As proteínas foram separadas em gradiente descontínuo de acetonitrila ajustado empiricamente, conforme Tabela 02.

**Tabela 02** - Gradiente descontínuo de eluição das proteínas na cromatografia de fase reversa (RP-HPLC), sendo a solução A formada por TFA 0,1% (v/v) e a B, por TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v)

Tempo de eluição (min)	Concentração do solvente B (% v/v)	Concentração de Acetonitrila (% v/v)
0,01	T. Flow	0
0,01	10,0	8,0
27	32,5	26,0
28	39,0	31,2
35	42,5	34,0
36	45,0	36,0
56	45,0	36,0
57	51,0	40,8
82	59,5	47,6
85	100,0	80,0
95	100,0	80,0
95,01	10,0	8,0
105	10,0	8,0

Os perfis de eluição indicaram a presença de diversos picos comuns para os extratos de sementes não germinadas (Figura 09 A) e germinadas por diferentes tempos (Figura 09 B a E), embora as soluções-tampão usadas para o preparo dos extratos de sementes germinadas e não germinadas não tenham sido as mesmas. Essas separações foram realizadas em triplicata, gerando perfis essencialmente idênticos, e um perfil de cada extrato foi apresentado na Figura 09.

A sobreposição dos perfis de eluição das cromatografias de fase reversa dos extratos de sementes germinadas e não germinadas (Figura 10) indicou a presença de picos com diferentes tempos de eluição nos diferentes perfis, que podem corresponder a conjuntos de proteínas e/ou peptídeos distintos, sintetizados ao longo das 96 h iniciais de germinação das sementes de soja. Vale



**Figura 09** - Cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC dos *pools* catiônicos da cromatografia de troca aniônica. (A) Semente não germinada de soja UFV 16; Semente germinada por: (B) 24 h; (C) 48 h; (D) 72 h e (E) 96 h. A coluna foi equilibrada em 10,0% do solvente B e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo crescente de acetonitrila (8 a 80%) (linha vermelha), a um fluxo de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: 0,1% de TFA e acetonitrila 80% (v/v). Círculos 1 e 2 referem-se a regiões de síntese de diferentes proteínas durante a germinação.

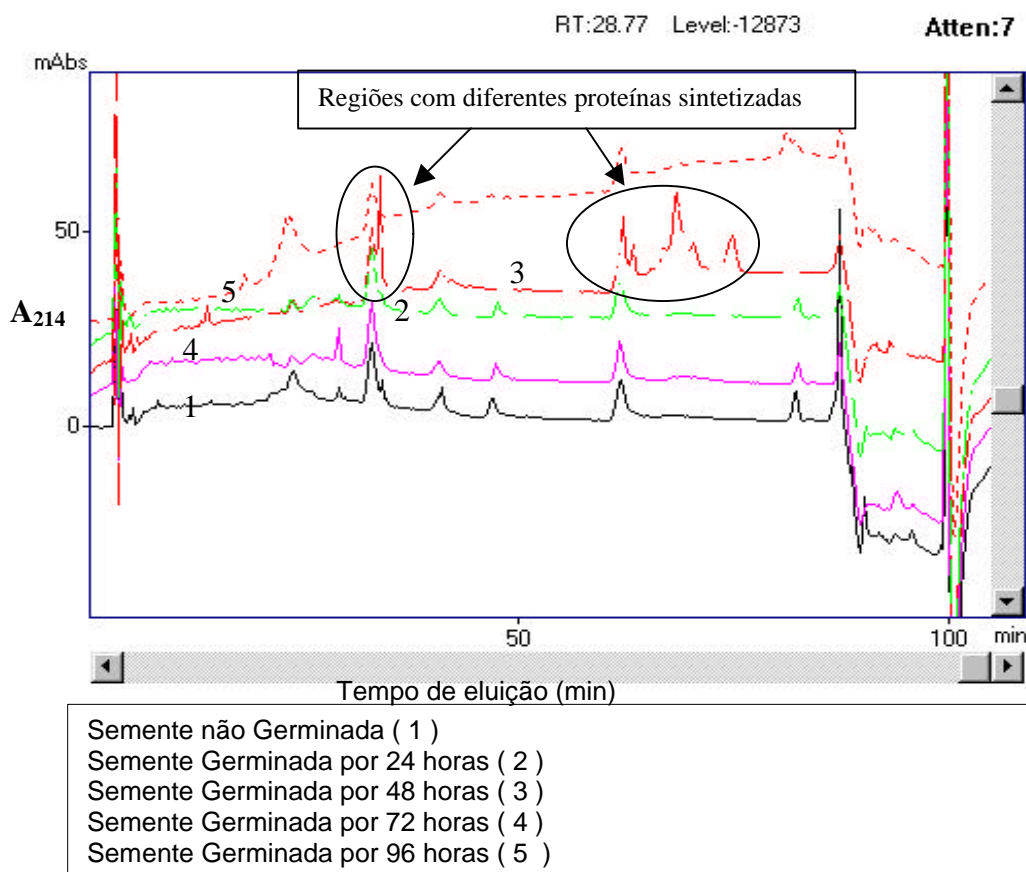
ressaltar, que as técnicas até então utilizadas visam selecionar moléculas protéicas e peptídicas de massa molecular menor que 10 kDa, catiônicas, possivelmente com pontes dissulfeto, o que promove maior termorresistência.

Os peptídios catiônicos, em geral, têm cerca de 50% dos resíduos aminoácídicos apolares e são eluídos em concentrações de acetonitrila entre 20 e 40% (v/v) (Terras *et al.*, 1992; Almeida *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001, Fogaça *et al.*, 2004). Nos perfis de eluição (Figura 09), tal região corresponde ao tempo de eluição entre 18 e 57 min. Para as sementes germinadas por 24 e 72 h, os perfis nessa região de concentração de acetonitrila são muito semelhantes ao de sementes não germinadas, à exceção da não observação de um grupo de proteínas em 20-25 min e 35 min de eluição; e para 72 h de germinação ocorreu aumento de um pico eluído em cerca de 28-30 min. Para 96 h de germinação, observa-se o reaparecimento dos picos na região protéica eluída em 20-25 min, sugerindo a presença de outro grupo de proteínas. O restante de cada perfil cromatográfico mostrou-se bastante semelhante para os extratos de sementes não germinadas e germinadas pelo diferentes tempos de germinação.

Para sementes germinadas por 48 h, duas regiões contendo picos protéicos eluídos em diferentes tempos foram observadas, uma próxima aos 35 min de eluição (33-36% de acetonitrila), e outra entre 60 e 80 min de eluição (41 a 47% de acetonitrila, aproximadamente), estando em destaque na Figura 10. A primeira região protéica, eluída em concentração de acetonitrila inferior a 40% (v/v), encontra-se na faixa esperada a eluição dos peptídios catiônicos, 20 a 40% (v/v) de acetonitrila, e sugere corresponder a um conjunto de peptídios com caráter hidrofóbico, conforme descrito por vários autores. Picos eluídos numa concentração de acetonitrila inferior a 8% devem apresentar características pouco hidrofóbicas, o que não é esperado para os peptídios catiônicos de interesse.

A segunda região de síntese de diferentes proteínas/peptídios, para as sementes germinadas por 48 h (Figura 10), indica a presença de moléculas com caráter hidrofóbico mais forte, uma vez que para sua eluição foi necessária a concentração de acetonitrila entre 40 e 50%, que pode conter peptídios maiores ou proteínas pequenas com características apolares.

A partir desses resultados, propôs-se trabalhar com as sementes germinadas por 48 h, como fonte de peptídios de interesse.



**Figura 10** – Cromatografias de fase reversa em C18-HPLC dos *pools* catiônicos (Figura 07) de sementes germinadas por diferentes tempos e sementes não germinadas de soja UFV 16. Duas regiões com picos protéicos indicando diferentes proteínas/peptídios estão destacadas. A coluna foi equilibrada em 10,0% do solvente B e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo crescente de acetonitrila (8 a 80%), a um fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, conforme Tabela 02. Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: 0,1% de TFA e acetonitrila 80% (v/v).

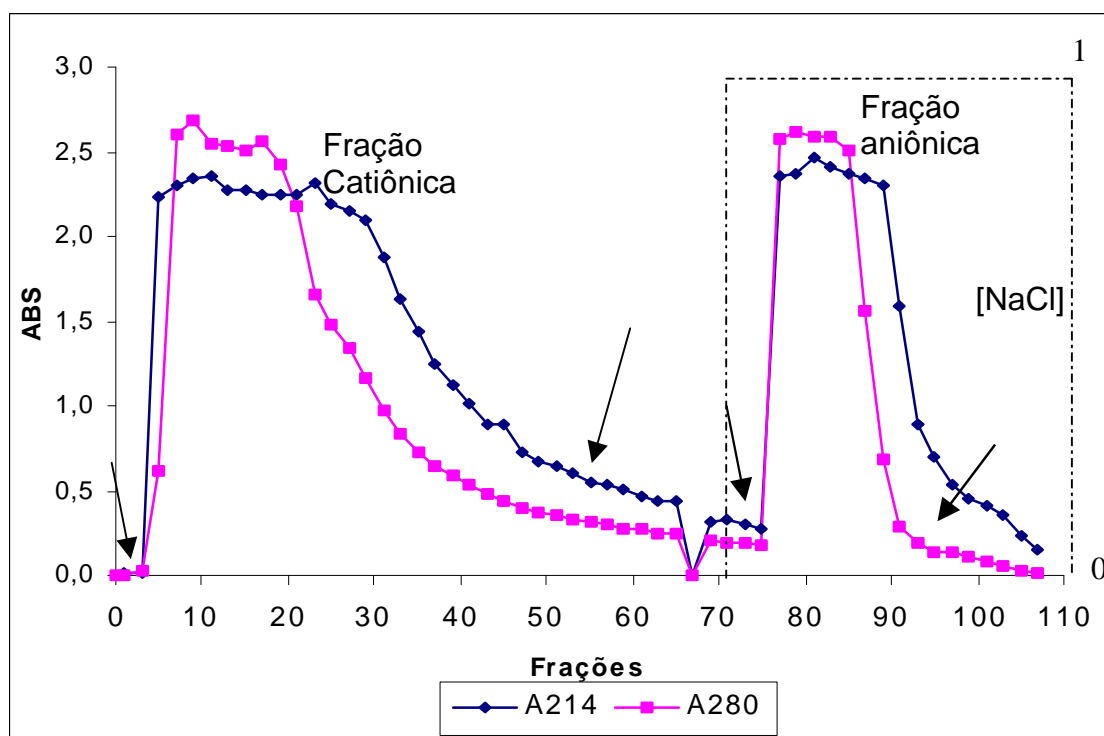
Ao lado da liberação de compostos de defesa, como os peptídios antimicrobianos (Terras *et al*, 1995), proteínas com diversas funções serão sintetizadas durante a germinação da soja. Como exemplo, a degradação de proteínas de reserva de sementes é um passo crítico no processo de germinação e crescimento da nova planta, à semelhança do processo de proteólise limitada que ocorre em sementes de soja durante a germinação e o crescimento inicial. A Protease C1 de soja pode clivar a proteína  $\beta$ -conglucina (uma proteína de reserva) em vários sítios diferentes, gerando intermediários de massa molecular de 1 a 2 kDa e outras proteínas de 50 a 65 kDa, subseqüentemente degradadas

por outras enzimas (Tan-Wilson *et al.* 1996). Carboxipeptidases de algumas plantas, como soja, têm atividade aumentada durante a germinação (Shutov *et al.*, 1987).

## **5.2 – Purificação os peptídios de sementes de soja germinadas por 48 horas**

Com base nos resultados anteriores, o tempo de germinação por 48 horas se mostrou mais adequado para continuidade do trabalho, como fonte de peptídios de interesse. Para tal, nova extração foi realizada, em que utilizou-se 312,05 g (930 sementes), seguindo-se a precipitação com sal e o aquecimento, conforme o item 4.5. O dialisado obtido foi submetido à cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose, a um fluxo de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , e foram recuperadas as proteínas catiônicas (fração não ligada à coluna) (Figura 11). Essas proteínas foram reunidas em um *pool*, que foi dialisado e concentrado cerca de 180 vezes (780 mL concentrados para 4,3 mL, aproximadamente), e foi utilizado como amostra em cromatografias de troca catiônica (4,0 mL) conforme fluxograma (Figura 12). Parte deste material foi utilizada para teste de inibição de patógenos.

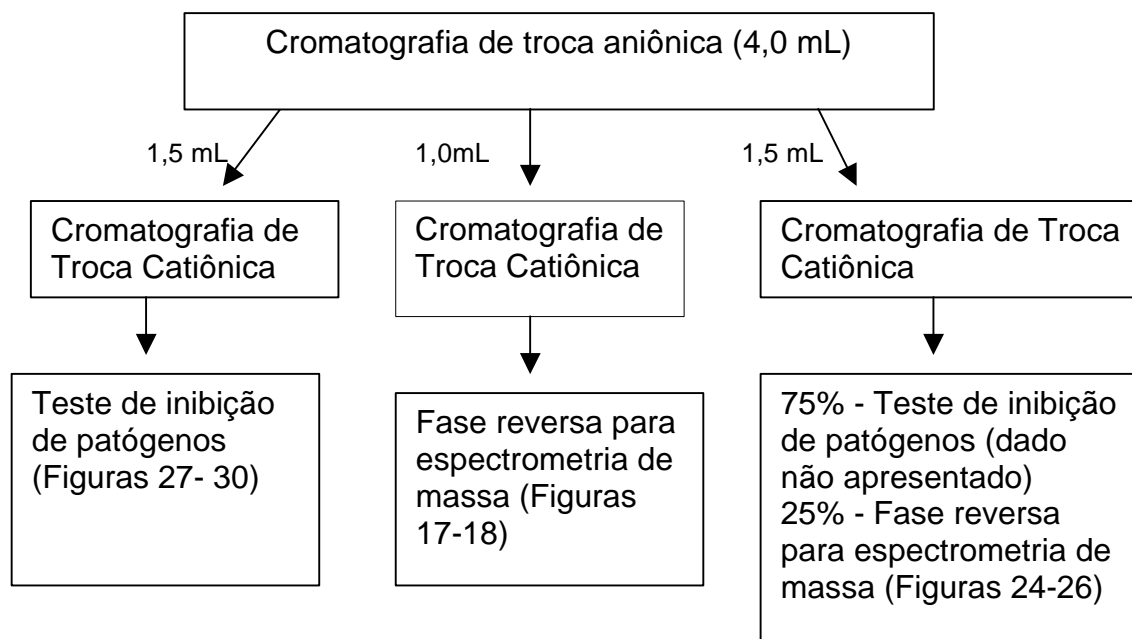
O equipamento tipo FPLC utilizado para as cromatografia de troca aniônica permite leitura de absorvância dos eluatos da coluna apenas a 280 nm, a qual avalia a ressonância dos elétrons dos anéis aromáticos dos aminoácidos. Uma vez que as seqüências aminoacídicas dos peptídios que estão sendo purificados não são conhecidas, estes poderiam apresentar baixo número de resíduos aromáticos, dificultando sua detecção a 280nm. Sendo assim, tornou-se necessária a avaliação da  $A_{214}$  nm, que avalia a ressonância eletrônica presentes nas ligações peptídicas, e que possibilitaria a identificação da presença de todos peptídios. Desta forma, o perfil de eluição protéica de uma das cromatografias de troca aniônica foi monitorado em espectrofotômetro pelas leituras das  $A_{214}$  e  $A_{280}$  simultaneamente (Figura 11) quando confirmou-se que toda a fração de interesse estava sendo recuperada no *pool* catiônico, mesmo com o acompanhamento apenas da  $A_{280}$ . Já para o *pool* aniônico, o conjunto de proteínas na região direita



**Figura 11** – Cromatografia de troca aniônica a baixa pressão em coluna DEAE-Sepharose (20,0 mL) do extrato de sementes de soja germinadas por 48 h, da variedade UFV 16, precipitado com sulfato de amônio (35% sat.) e aquecido a 80 °C / 15 min. A coluna foi equilibrada no tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, e as proteínas foram eluídas no mesmo tampão em ausência e em presença de 1 M de NaCl (linha pontilhada). Foram coletadas frações de 1,0 mL a um fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e a presença das proteínas nos eluatos foi determinada pela A<sub>214</sub> e A<sub>280</sub>. Os *pools* de proteínas catiônicas e aniônicas estão entre as setas, sendo frações 5 e 55, e frações 78 a 90, respectivamente.

do pico pode ter sido perdido, já que foram recuperadas as proteínas presentes apenas até na fração 90 da Figura 11.

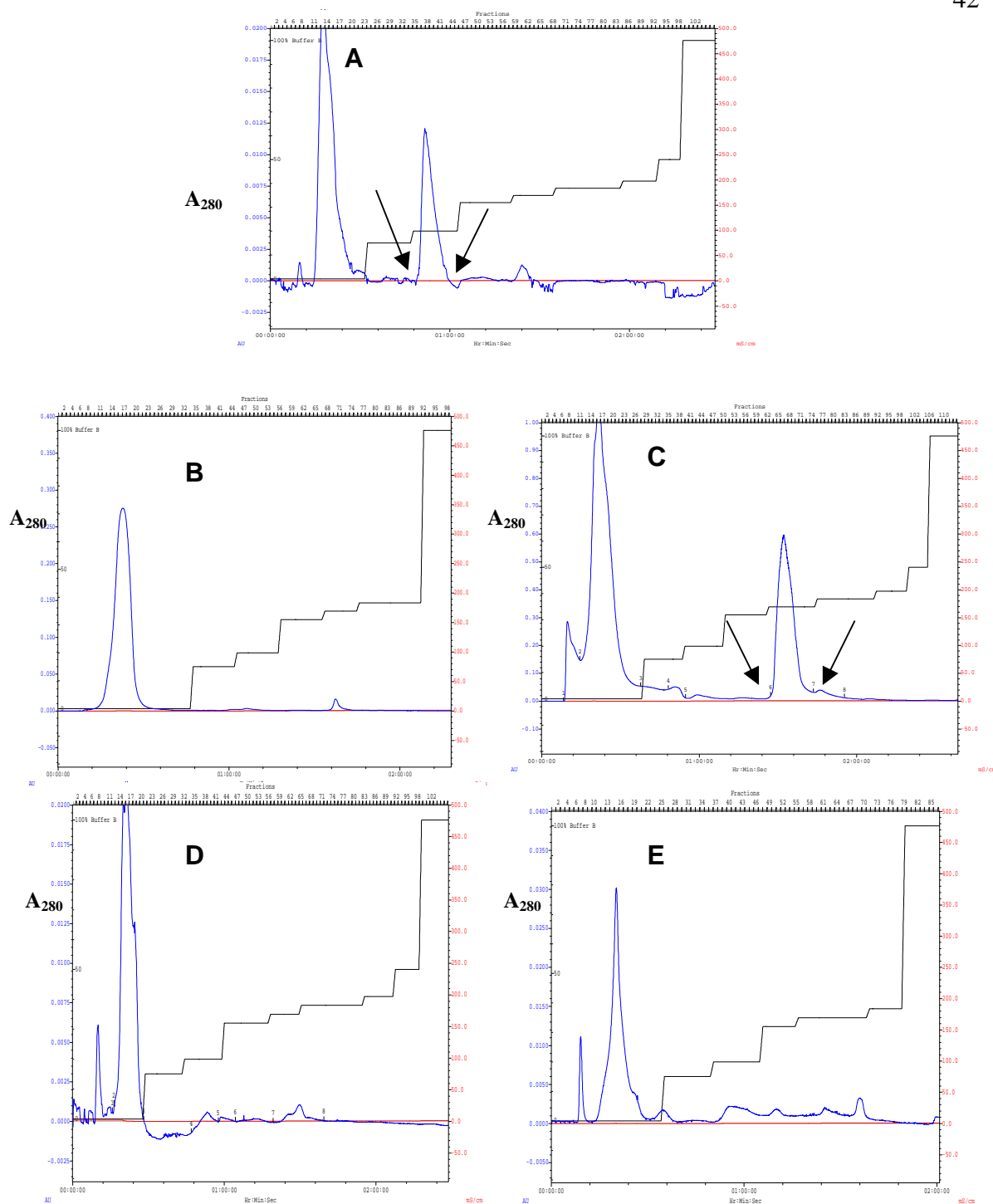
Visando melhorar a separação dos peptídios de interesse, foi introduzida, como etapa de purificação, uma cromatografia de troca catiônica do *pool* catiônico obtido das cromatografias de troca aniônica. Após dialisado e liofilizado, este foi separado em coluna CM-Sepharose (20 mL,  $\phi = 0,75$  cm,  $h = 12$  cm) em equipamento do tipo FPLC, a um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. As proteínas foram eluídas em gradiente descontínuo de NaCl, determinado empiricamente, no tampão de equilíbrio (MES 50mM, pH 6,0), na ausência ou presença de 0,15; 0,20; 0,32; 0,35; 0,40; 0,45 e 1,00 M de NaCl.



**Figura 12** - Fluxograma da distribuição (em mL) do *pool* catiônico da cromatografia de troca aniônica, conforme etapas de uso.

O uso de cromatografia de troca catiônica como etapa de purificação teve como principal objetivo separar quantidades maiores de peptídios eluídos da troca aniônica, já que as cromatografias de fase reversa trabalham com cerca de 20 a 50  $\mu\text{L}$  de amostra pouco concentrada. A capacidade de separação da resina CM-Sepharose é de cerca de 50 mg de proteína (RNase) por mL de resina. Entretanto, possivelmente, por tratar-se de um trocador de cátions fraco, a resina não permitiu uma boa separação da amostra (Figura 13).

A separação na coluna de troca catiônica (Figuras 13 A a E) confirmou que diferentes proteínas/peptídios são sintetizados especialmente no tempo de germinação de 48h, confirmando observações anteriores (Figura 09 e 10). Observou-se aqui a eluição de um pico em 0,35 M de NaCl para 48 h, o que não ocorreu para os demais tempos de germinação e para a semente não germinada. Observou-se que essas proteínas sintetizadas durante a germinação por 48h necessitam de uma maior força iônica para eluição na coluna de troca catiônica do que as proteínas de semente não germinada. Por possuírem carga líquida positiva, os peptídios catiônicos são, no geral, eluídos em concentrações entre 0,2 e 0,5 M de NaCl (Terras *et al*, 1993, Osusky *et al*, 2000).



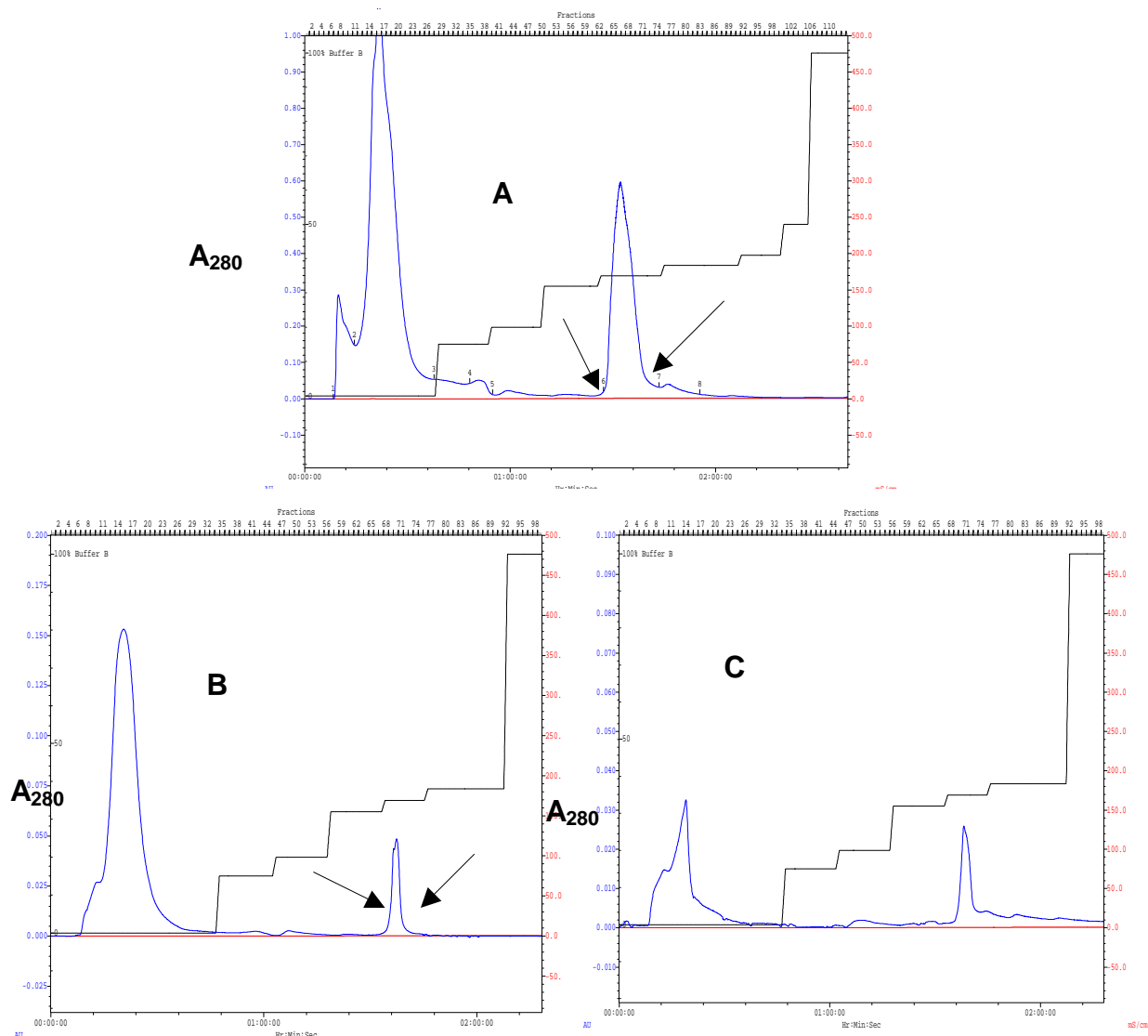
**Figura 13** - Cromatografias de troca catiônica (tipo FPLC) em coluna CM-Sephrose (20 mL) das frações catiônicas eluídas das cromatografias de troca aniônica (Figura 11), dialisadas e liofilizadas. A coluna foi equilibrada em tampão MES 50 mM, pH 6,0, e as proteínas foram eluídas em um gradiente descontínuo de NaCl, em presença ou ausência de 0,15; 0,20; 0,32; 0,35; 0,38; 0,42; 0,45 e 1,00 M, exceto em B e E, que não houve eluição em 0,45 M. Foram coletadas frações de 1,4 mL a um fluxo de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , para sementes não germinadas (A) e germinadas por (B) 24 h; (C) 48 h; (D) 72 h e (E) 96 h. As frações indicadas pelas setas em A e C foram submetidas à cromatografia de fase reversa.

As cromatografias de troca catiônica para os tempos de germinação de 24, 72 e 96 h (Figuras 13 B, D e E) apresentaram eluição de proteínas com diferentes valores de forças iônicas, porém em baixas concentrações, sugerindo que poucas proteínas catiônicas estavam presentes nesses extratos.

Uma vez que a fração resolvida na cromatografia catiônica a pH 6,0 foi previamente fracionada por exclusão na cromatografia aniônica a pH 7,0, era de se esperar que a fração catiônica enriquecida de proteínas positivas fosse retida na coluna catiônica. Entretanto, todos os cromatogramas obtidos (Figuras 13 A a E) apresentaram picos aniônicos com alta concentração protéica, indicando presença de proteínas aniônicas nessa fração. Visando explicar tal fato, a fração aniônica das sementes germinadas por 48 h (Figura 13 C) foi recromatografada, sob as mesmas condições (Figura 14 B), sendo observado perfil semelhante ao anterior. Então, a fração aniônica obtida (Figura 14 B) foi mais uma vez cromatografada (re-recromatografia, Figura 14 C) obtendo um perfil quase idêntico ao anterior. Para realização das (re-)recromatografias, foram utilizadas como amostra 1/3 de cada *pool* aniônico da cromatografia anterior. Estes resultados (Figura 14) indicaram que a resina trocadora de cátions (CM-Sepharose) está se comportando como um trocador fraco. Característica semelhante está sendo observada em nosso laboratório para a resina DEAE-Sepharose. O fator sobrecarga de proteínas nas resinas parece não ocorrer, já que os valores de  $A_{280}$  máximos encontrados nas Figuras 14 B e C foram em torno de 30% e 9% do valor máximo da Figura 14 A.

Outra possível razão para a ocorrência desse fato pode estar relacionada à presença de um grupo de proteínas ou peptídios com ponto isoelétrico próximo a 6,0 e 7,0 que, quando submetidos à cromatografia de troca catiônica em pH 6,0, ou troca aniônica em pH 7,0, apresentaram carga líquida aproximadamente nula, não sendo capazes de se ligar às resinas.

Os cromatogramas obtidos (Figuras 14) sugerem que as proteínas poderiam estar se ligando às resinas cromatográficas com diferentes graus de afinidade, em função dessa resina ser um trocador de íons fraco e permitir facilmente o deslocamento de proteínas por outras com características semelhantes. Visando verificar se proteínas diferentes haviam sido eluídas na cromatografia e recromatografia de troca catiônica (Figuras 14 A e B), foram



**Figura 14** - Recromatografias seqüenciais (B e C) da fração aniônica eluída da cromatografia de troca catiônica (A) de extrato de sementes de soja germinadas por 48 h, desenvolvidas em coluna de troca catiônica (tipo FPLC) CM-Sepharose (20 mL). Para todas as corridas, a coluna foi equilibrada em tampão MES 50 mM, pH 6,0, e as proteínas foram eluídas em gradiente descontínuo de NaCl, em presença ou ausência de 0,15; 0,20; 0,32; 0,35; 0,38; 0,42; 0,45 e 1,00 M, exceto em B e C que não houve eluição em 0,45 M. Foram coletadas frações de 1,4 mL a um fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. Os *pools* aniônicos formados pelas frações entre as setas foram dialisados, liofilizados e usados como amostra na recromatografia seqüencial (*pool* aniônico de A foi amostra para B, e *pool* aniônico de B foi amostra para C) As frações indicadas pelas setas em A e B foram submetidas à cromatografia de fase reversa.

realizadas cromatografias de fase reversa. Para estas cromatografias utilizou-se os *pools* eluídos em 0,35M de NaCl (Figura 13C), previamente dialisados, filtrados e liofilizados, e indicaram que, aproximadamente, os mesmos picos protéicos estão presentes nas duas amostras (Figura 15), porém com amplitudes diferentes

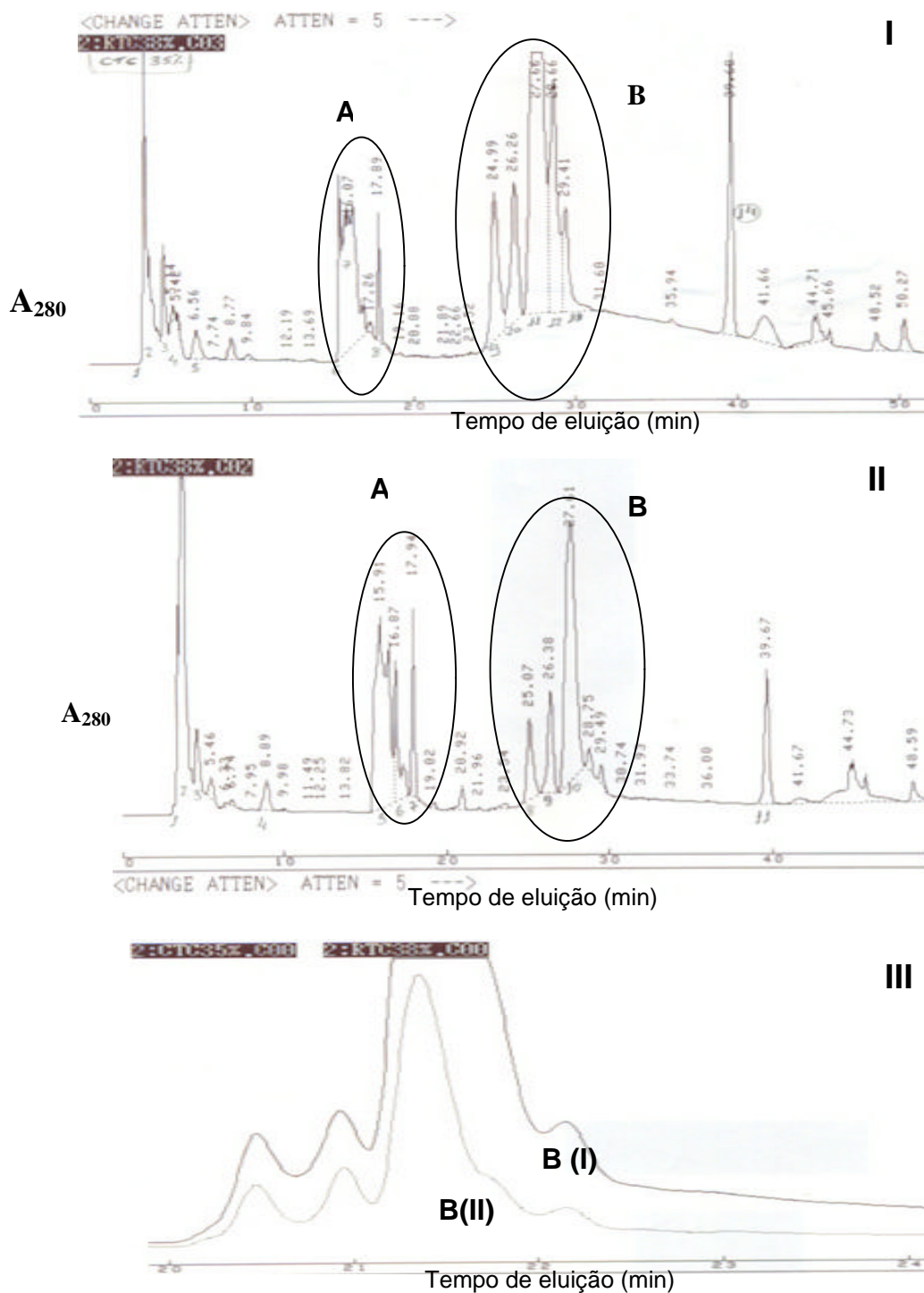
para os diversos picos observados, sugerindo diferenças de concentração das proteínas eluídas. A sobreposição das regiões destacadas nas Figuras 15 A e B evidencia a grande semelhança nesses perfis protéicos (Figura 15 C). Assim, pode-se inferir que o *pool* aniônico da cromatografia de troca catiônica contém uma fração das proteínas/peptídios de interesse, que não foram capazes de se ligar à resina.

As proteínas foram separadas em gradiente descontínuo de acetonitrila, sendo o gradiente de eluição 0-10 min, 0% de B; 10-12 min, 0 a 40% de B; 12-18 min, 40% de B; 18-38 min, 40-70% de B; 38-40min, 70-100% de B; 40-50 min, 100% de B e 50-50,1 min, 10% de B (Figuras 15 e 16).

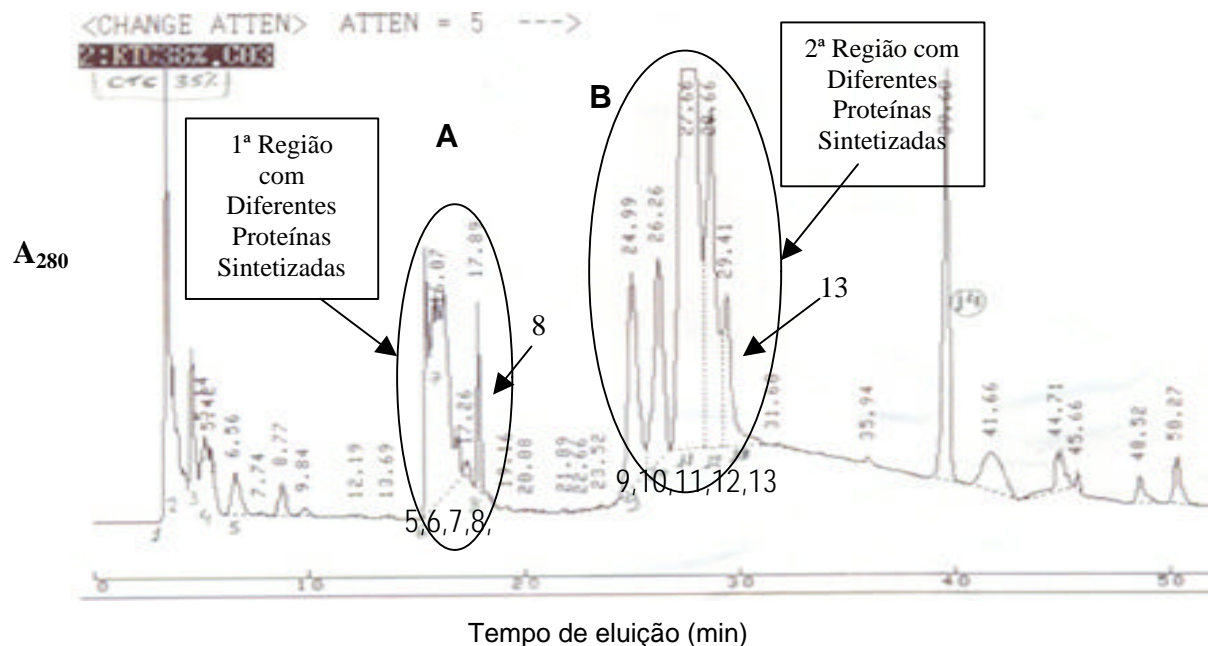
No perfil cromatográfico da Figura 15, duas regiões com diferentes proteínas/peptídios sintetizados para sementes germinadas por 48 h estão em destaque, em relação a extratos de sementes não germinadas. Nos 10 minutos iniciais da corrida cromatográfica, observa-se a eluição de proteínas com baixa hidrofobicidade, de pouco interesse, pois no geral os peptídios têm cerca de 50% de resíduos hidrofóbicos. Entre 15 e 18 min, foram eluídos quatro picos não homogêneos, na concentração de acetonitrila de 32%. Entre 25 e 29 min, um novo conjunto de picos, melhor resolvido, foi eluído em concentrações de acetonitrila de 37,5 a 45,7%.

Os picos resolvidos na cromatografia de fase reversa foram liofilizados e ressuspensos em 50  $\mu$ L de TFA 0,1% e aplicados, via *loop*, em um espectrômetro de massa tipo *Electron-spray*, ou utilizados para testes de inibição de fitopatógenos.

Inicialmente, os picos 9 a 13 do segundo conjunto das diferentes proteínas sintetizadas foram submetidos à espectrometria de massa. Para os picos 9 a 12, não foi possível identificar as massas moleculares pela presença de muitos ruídos que acompanhavam os picos protéicos (Pimenta, A. M. C./UFMG, comunicação pessoal ). Este tipo de interferência pode ocorrer em função da dificuldade de ionização das moléculas, o que é característico de proteínas de massas moleculares maiores. No eluato correspondente ao pico 13, identificou-se, por diferentes ionizações ( $A_9$  a  $A_{14}$ ), uma proteína com uma massa média de 23.040,63 Da (Figura 17)



**Figura 15** – Cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC dos *pool/s* catiônicos da cromatografia (I) e recromatografia (I) de troca catiônica de semente de soja germinada por 48 h, dos picos eluídos em 0,35 M (Figuras 14 A e B, respectivamente). Em C, sobreposição dos perfis de cromatografia das frações de B (I) (linha escura) e sua recromatografia B(II) (linha clara). A coluna foi equilibrada em 10,0% do solvente B e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo de acetonitrila (8 a 80%), a um fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: 0,1% de TFA e acetonitrila 80% (v/v).

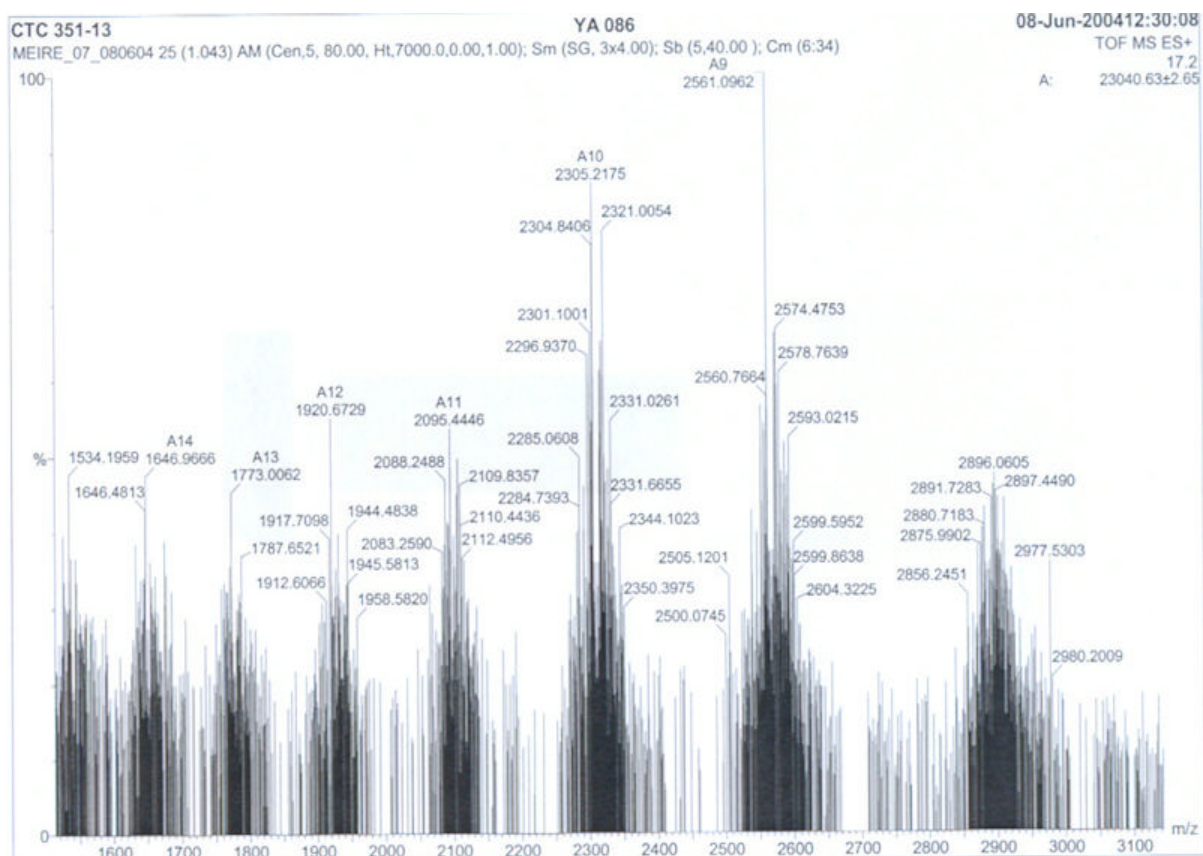


**Figura 16** - Cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC do *pool* catiônico da cromatografia de troca catiônica de semente de soja germinada por 48 h. A coluna foi equilibrada no solvente A e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo crescente de acetonitrila (0 a 80%), a um fluxo de  $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: 0,1% de TFA e acetonitrila 80% (v/v).

A análise espectrométrica dos picos 9 a 13 da Figura 16 sugeriu a presença de peptídios grandes ou proteínas pequenas presentes nestes picos. Embora o objetivo inicialmente proposto tenha sido de identificar diferentes peptídios sintetizados em sementes de soja germinadas, esse grupo de proteínas de maior massa molecular possivelmente tem grande relevância na fisiologia da germinação das sementes, podendo talvez apresentar atividade antimicrobiana, e que serão posteriormente avaliadas pelo nosso grupo de trabalho.

Os picos identificados na primeira região com diferentes proteínas sintetizadas também foram submetidos à espectrometria de massa. Esses picos, eluídos em 32% de acetonitrila, estão na faixa esperada de concentração do solvente, podendo corresponder a peptídios com caráter hidrofóbico (Terras *et al.*, 1992; Almeida *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001, Fogaça *et al.*, 2004). Apenas para o pico 8 (Figura 16) foi possível identificar um peptídio (ionizações A e A<sub>2</sub>), de massa molecular média 1.305,89 Da (Figura 18).

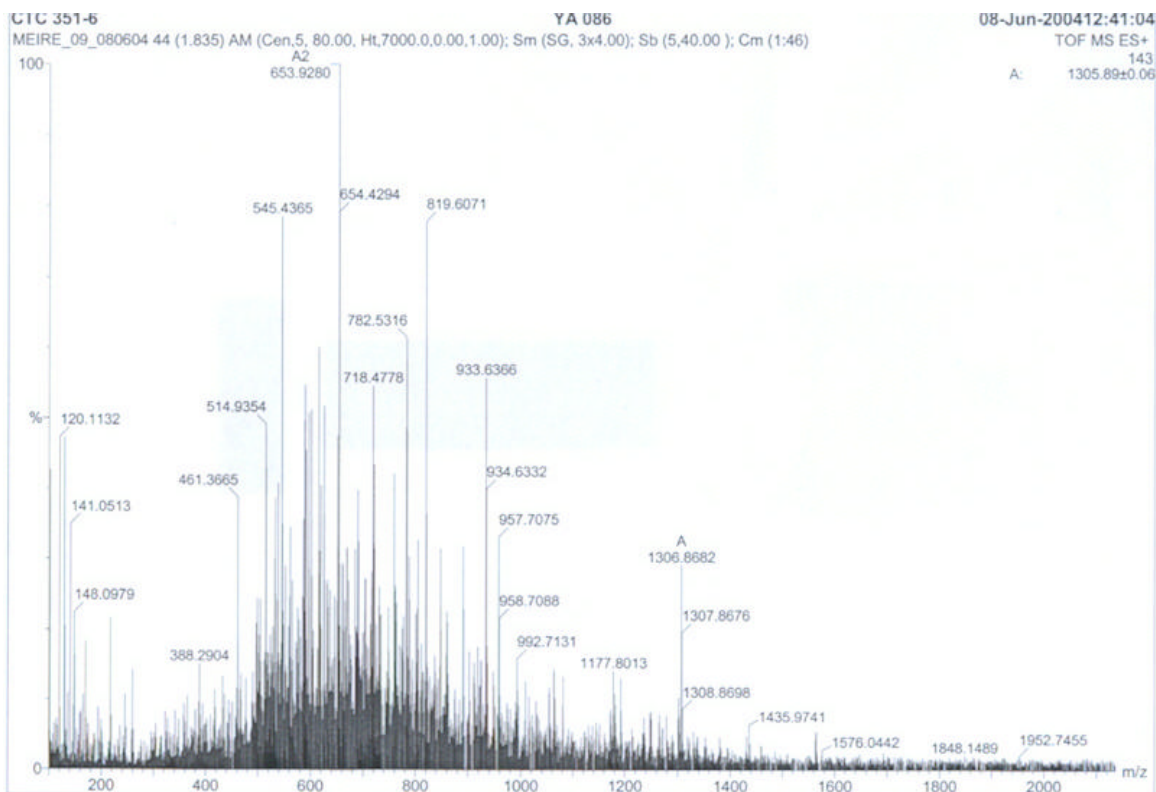
Os demais picos não puderam ser analisados devido à baixa concentração das amostras (Pimenta, A. M. C., comunicação pessoal). Foi então desenvolvida



**Figura 17** - Espectrometria de massa do pico 13, eluído em 45,7% de acetonitrila na cromatografia de fase reversa (Figura 16) do *pool* da fração catiônica eluído com 0,35 M de NaCl da cromatografia de troca catiônica (Figura 13 C).

uma eletroforese em SDS-Tricina com os demais picos obtidos na cromatografia de fase reversa, quando observou-se uma banda peptídica em torno de 9 kDa para o pico 7, e as demais frações não foram observadas nitidamente no gel (dados não mostrados).

A partir dos resultados da espectrometria de massa (Figuras 17 e 18), um novo gradiente de eluição foi proposto para as cromatografias de fase reversa, visando otimizar a separação dos peptídios eluídos em concentrações de acetonitrila inferiores a 40%, enquanto que a região seguinte foi compactada: 0-10 min, 0% de B; 10-50 min, 0-40% de B; 51-61 min, 40-100% de B e 61,1 min, 100% de B (Figuras 19 a 22). O eluato da cromatografia de troca catiônica (Figura 13 C), dialisado, filtrado, liofilizado, ressuspendido em água Milli-Q e separado na nova cromatografia de fase reversa (Figura 19), gerou 14 picos em uma faixa de concentração de acetonitrila de 11 a 32% (Tabela 03).



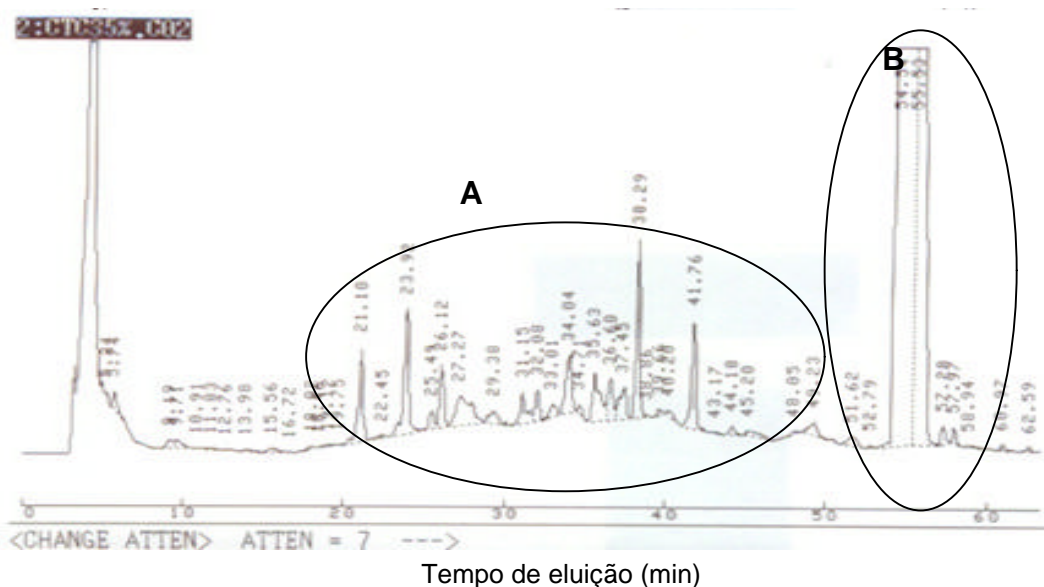
**Figura 18** - Espectrometria de massa do pico 8, eluído em 32% de acetonitrila na cromatografia de fase reversa (Figura 16) do pool da fração catiônica eluído com 0,35 M de NaCl da cromatografia de troca catiônica (Figura 13C).

Considerando que semente de soja não germinada foi a referência de comparação na identificação das moléculas de interesse, o eluato de sementes não germinadas após troca catiônica (Figura 13 A, em 0,2% de NaCl) foi submetido à cromatografia de fase reversa (Figura 20), sob as mesmas condições que o eluato das sementes germinadas por 48h (Figura 13 C, em 0,35 de NaCl) . Embora os extratos tenham sido preparados em diferentes tampões, a comparação desses perfis cromatográficos mostrou que, entre as concentrações de 11 e 32% de acetonitrila, 14 picos foram identificados em sementes germinadas por 48 h, enquanto que apenas 5 picos foram detectados para sementes não germinadas (Figura 21). Estes dados reafirmam que, nas etapas iniciais de germinação das sementes de soja, uma série de proteínas/peptídios estão sendo sintetizados, e sua identificação certamente auxiliará no estudo fisiológico do processo de germinação para a planta.

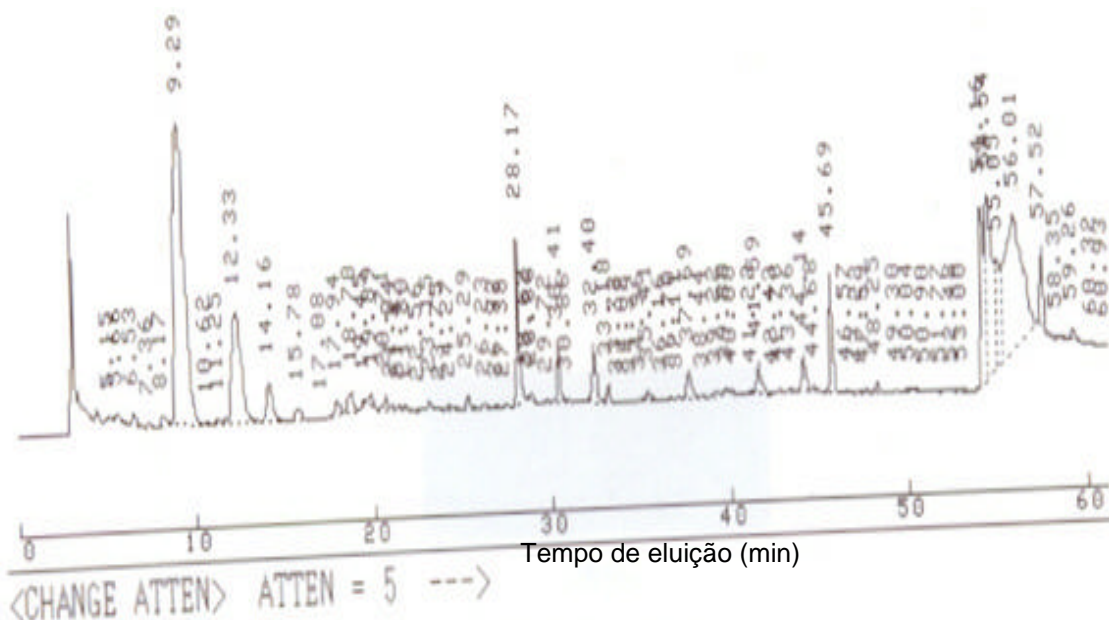
**Tabela 03** - Tempo de retenção e concentração de acetonitrila (% v/v) dos 14 picos protéicos sintetizados em sementes de soja germinadas por 48 h, separados por cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC

Picos eluídos da Fase Reversa	Tempo de Eluição (min)	Acetonitrila (% v/v)
1	21,10	11,10
2	23,92	13,92
3	26,12	16,12
4	27,27	17,27
5	29,38	19,38
6	31,15	21,15
7	32,08	22,08
8	33,01	23,01
9	34,04	24,04
10	35,63	25,63
11	36,60	26,60
12	37,45	27,45
13	38,29	28,29
14	41,72	31,72

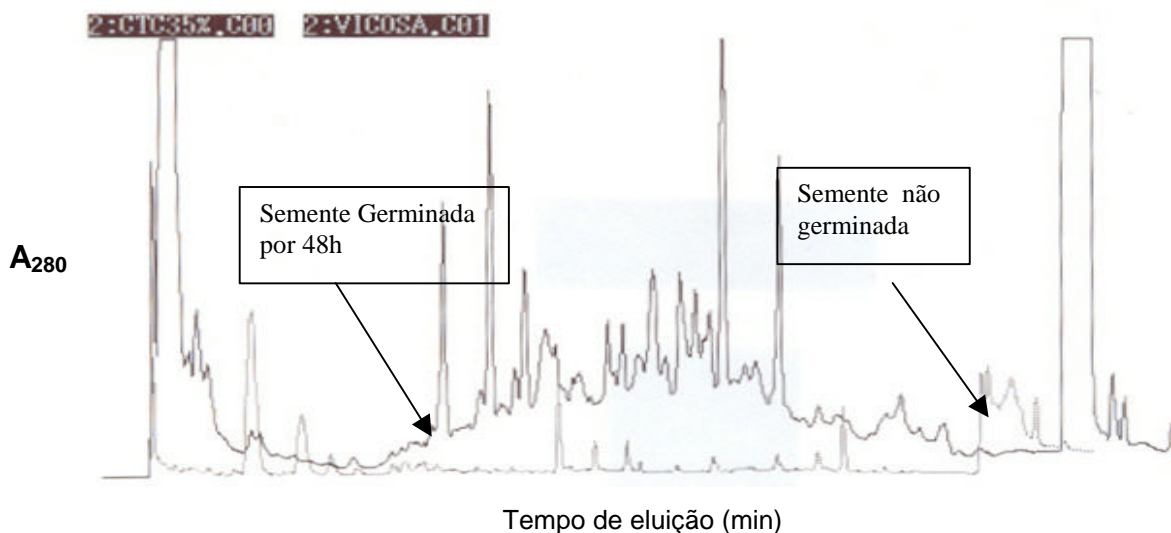
Conforme o fluxograma de utilização das amostras obtidas por troca catiônica (Figura 12), cromatografias de fase reversa foram repetidas para o desenvolvimento de testes de atividade antimicrobiana e análises espectrométricas. Uma alíquota do extrato catiônico, idêntica à utilizada como amostra na cromatografia de fase reversa que gerou os picos separados (Figura 19), foi mantida a -20° C por cerca de 7 dias, descongelada e submetida à cromatografia de fase reversa (Figura 22), gerando um conjunto de picos eluídos em tempos diferentes dos anteriores, para a região de eluição inferior a 40% do solvente. A comparação entre esses perfis, por sobreposição das Figuras 19 e 22 (Figura 23) mostrou que novos picos puderam ser identificados enquanto outros não foram encontrados neste novo perfil.



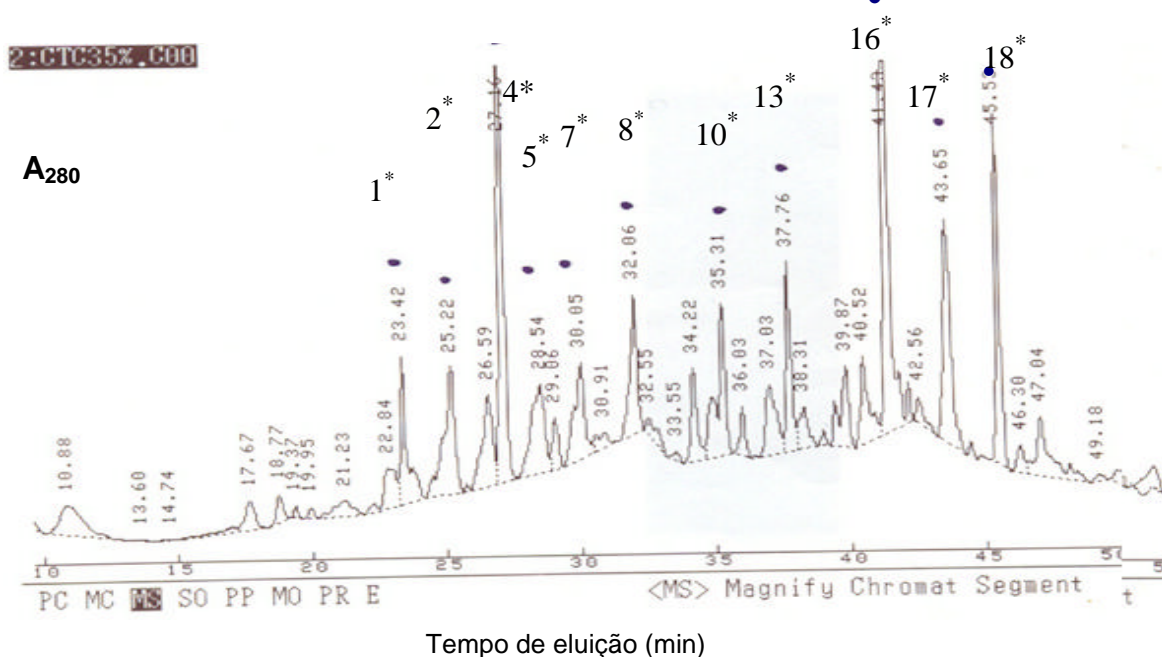
**Figura 19** – Cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC do *pool* catiônico da cromatografia de troca catiônica de semente de soja germinada por 48 h. A coluna foi equilibrada no solvente A e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo crescente de acetonitrila (0 a 80%), a um fluxo de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: 0,1% de TFA e acetonitrila 80% (v/v). (A) Região de proteínas eluídas entre 11 e 32% de acetonitrila, expandida; (B) Região de proteínas eluídas em concentrações de acetonitrila superiores a 40%, compactada.



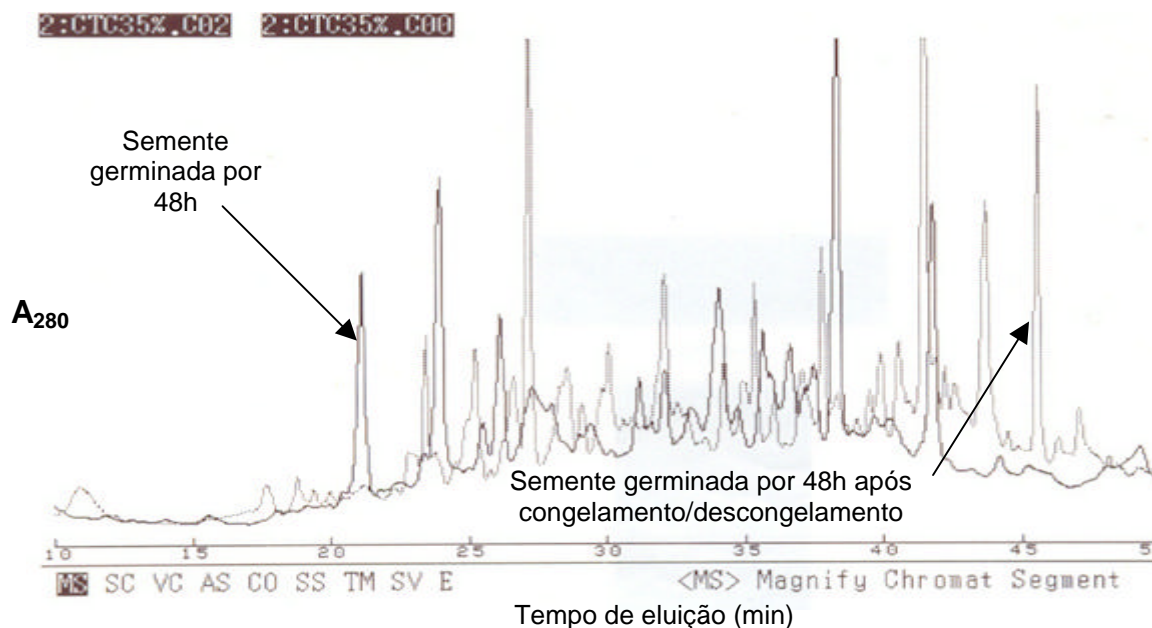
**Figura 20** - Cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC do *pool* catiônico da cromatografia de troca catiônica de semente de soja não germinada. A coluna foi equilibrada no solvente A e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo crescente de acetonitrila (0 a 80%), a um fluxo de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: 0,1% de TFA e acetonitrila 80% (v/v).



**Figura 21** - Sobreposição dos perfis de eluição das cromatografias de fase reversa (C18-HPLC) dos *pools* catiônicos das cromatografias de troca catiônica das sementes de soja não germinadas e germinadas por 48 h. A coluna foi equilibrada no solvente A e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo crescente de acetonitrila (0 a 80%), a um fluxo de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: 0,1% de TFA e acetonitrila 80% (v/v). Linha escura, semente germinada por 48 h; linha clara, semente não germinada.



**Figura 22** - Cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC do *pool* catiônico da cromatografia de troca catiônica de semente de soja germinada por 48 h. A coluna foi equilibrada no solvente A e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo crescente de acetonitrila (0 a 80%), a um fluxo de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Solvente A: TFA 0,1% (v/v) ; solvente B: 0,1% de TFA e acetonitrila 80% (v/v).



**Figura 23** - Cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC do *pool* catiônico da cromatografia de troca catiônica de semente de soja germinada por 48 h não congelada (linha escura) e congelada/descongelada (linha clara). A coluna foi equilibrada no solvente A e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo de acetonitrila (0 a 80%), a um fluxo de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: 0,1% de TFA e acetonitrila 80%(v/v).

Diferentes tempos de eluição de proteínas/peptídios, obtidos após a cromatografia de fase reversa (C18-HPLC) da fração catiônica para sementes germinadas por 48 h (Figura 23), foram observados para uma amostra submetida ao congelamento ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) e descongelamento (Tabela 04), quando comparada com a mesma amostra não congelada (Tabela 03). Sugeriu-se a presença de proteases no extrato protéico que poderiam degradar parcialmente proteínas gerando os diferentes perfis. Deve-se salientar que as plantas apresentam um conjunto de proteases com diferentes modos de ação, que podem ser ativadas durante a germinação (Shutov e Vaintraub, 1987), e que poderiam atuar degradando os peptídios de interesse. A degradação de proteínas de reserva de sementes é uma etapa importante da germinação, exemplificada pela proteólise limitada das proteínas de reserva na soja. Sabe-se que a Protease C1 de soja pode clivar a proteína de reserva  $\beta$ -conglícinina, gerando peptídios (1-2 kDa) e proteínas (50-65 kDa), envolvidos no processo (Tan-Wilson *et al.* 1996).

**Tabela 04** - Tempo de retenção e concentração de acetonitrila (% v/v) de 18 picos protéicos sintetizados em sementes de soja germinadas por 48 h, após congelamento e descongelamento da fração catiônica e separação por cromatografia de fase reversa em coluna C18-HPLC

Picos eluídos da Fase Reversa	Tempo de Eluição (min)	Acetonitrila (% v/v)
1*	23,42	13,42
2*	25,22	15,22
3**	26,59	16,59
4*	27,16	17,16
5*	28,54	18,54
6**	29,06	19,06
7*	30,05	20,05
8*	32,06	22,06
9**	34,22	24,22
10*	35,31	25,31
11**	36,03	26,03
12**	37,03	27,03
13*	37,76	27,76
14**	39,87	29,87
15**	40,52	30,52
16*	41,40	31,40
17*	43,65	33,65
18*	45,53	35,53

\* Picos selecionados para avaliação por espectrometria de massa;

\*\* Picos identificados e não selecionados para avaliação por espectrometria de massa.

Ainda como exemplo, carboxipeptidases de algumas plantas, como soja, têm atividade aumentada durante a germinação (Shutov e Vaintraub, 1987). Assim, a degradação proteolítica de proteínas de reserva de soja poderia estar dando origem a diferentes frações protéicas com pesos moleculares menores e variados, de maior ou menor caráter hidrofóbico (Figura 23).

Vale ressaltar que apenas os inibidores de serino-protease, PMSF e benzamidina, e o inibidor de metalo-proteases, EDTA, foram utilizados na etapa de extração, e podem não ter sido suficiente para controlar a atividade proteolítica no extrato, já que diferentes classes de proteases podem estar presente. Porém,

observa-se que a precipitação com sulfato de amônio e o aquecimento seletivo, ao lado das diferentes etapas de purificação, podem auxiliar na eliminação de algumas formas de proteases.

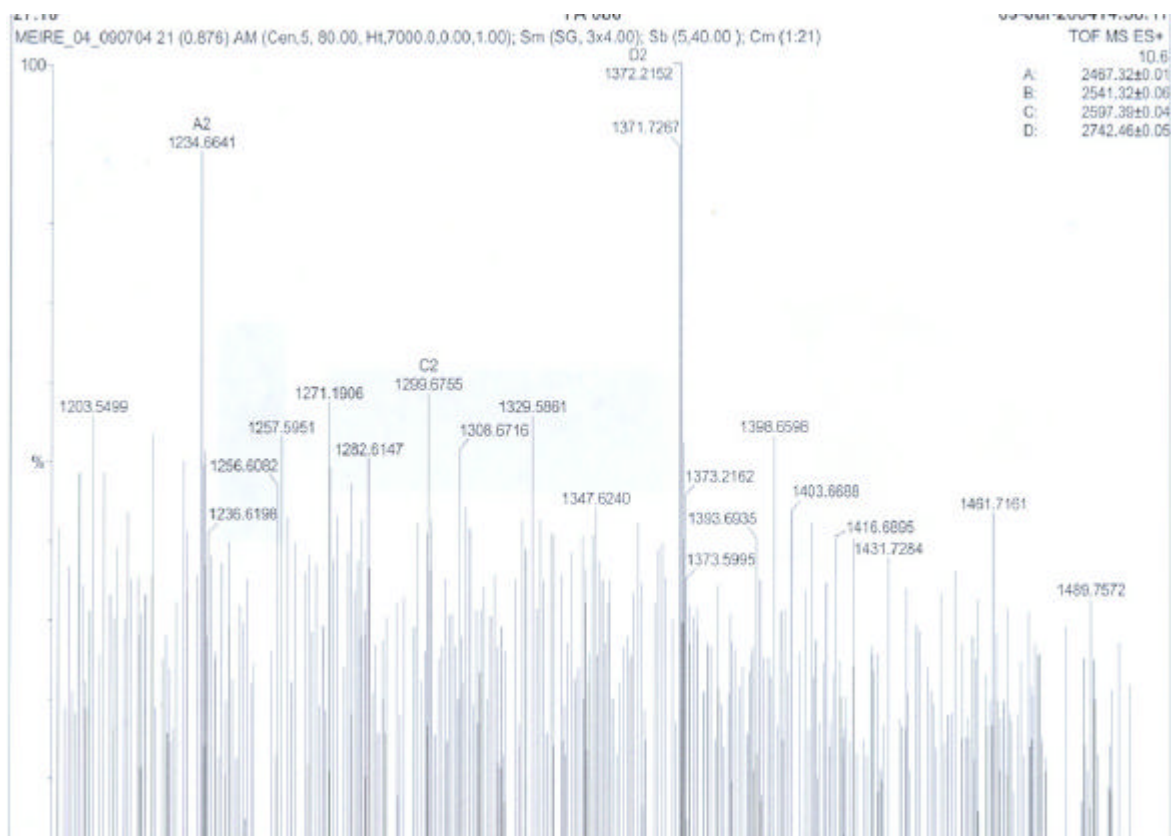
Apesar da possível proteólise da amostra, foram selecionados 11 dos 18 picos identificados nesse perfil (Tabela 04), que foram analisados por espectrometria de massa, que foram os eluatos dos picos 5\*, 8\* e 16\*, eluídos em 18,54; 22,06 e 31,40% de acetonitrila (Figuras 24, 25 e 26).

No pico 5\*, eluído com 18,54% de acetonitrila, observou-se a presença de quatro picos moleculares de massas média de 2.467,32; 2.541,32; 2.597,39 e 2.742,40 Da. A diferença entre os valores dessas massas moleculares (74,06; 56,07 e 145,01 Da) fornece valores próximos às massas moleculares médias dos resíduos de aminoácidos alanina (71,08 Da), glicina (57,05 Da) e fenilalanina (147,18 Da), o que pode sugerir a presença de um único peptídeo parcialmente degradado (Figura 24).

Para o pico 8\*, eluído em 32,06% de acetonitrila, foram identificados também quatro picos moleculares com massas de 3.357,92; 3.771,21; 6.431,85 e 9.062,2 Da, que estão na região de massas moleculares dos peptídeos de interesse neste trabalho (Figura 25). Esse pico parece conter três ou quatro peptídeos diferentes, uma vez que os dois picos de massas moleculares menores podem corresponder ao mesmo peptídeo (com remoção de resíduos aminoacídicos por ação proteolítica), ou ainda os peptídeos de menor massa poderiam ter-se originado dos de maior massa. Torna-se necessário o seqüenciamento de cada peptídeos, presentes nesse ou em outras frações, para verificar-se a ocorrência de possíveis homologias de seqüência.

No último pico avaliado, 16\*, eluído em 34,4% de acetonitrila, três picos moleculares foram identificados: 1.664,19; 5.131,2 e 9.214,47 (Figura 26), também correspondendo a formas de interesse no trabalho.

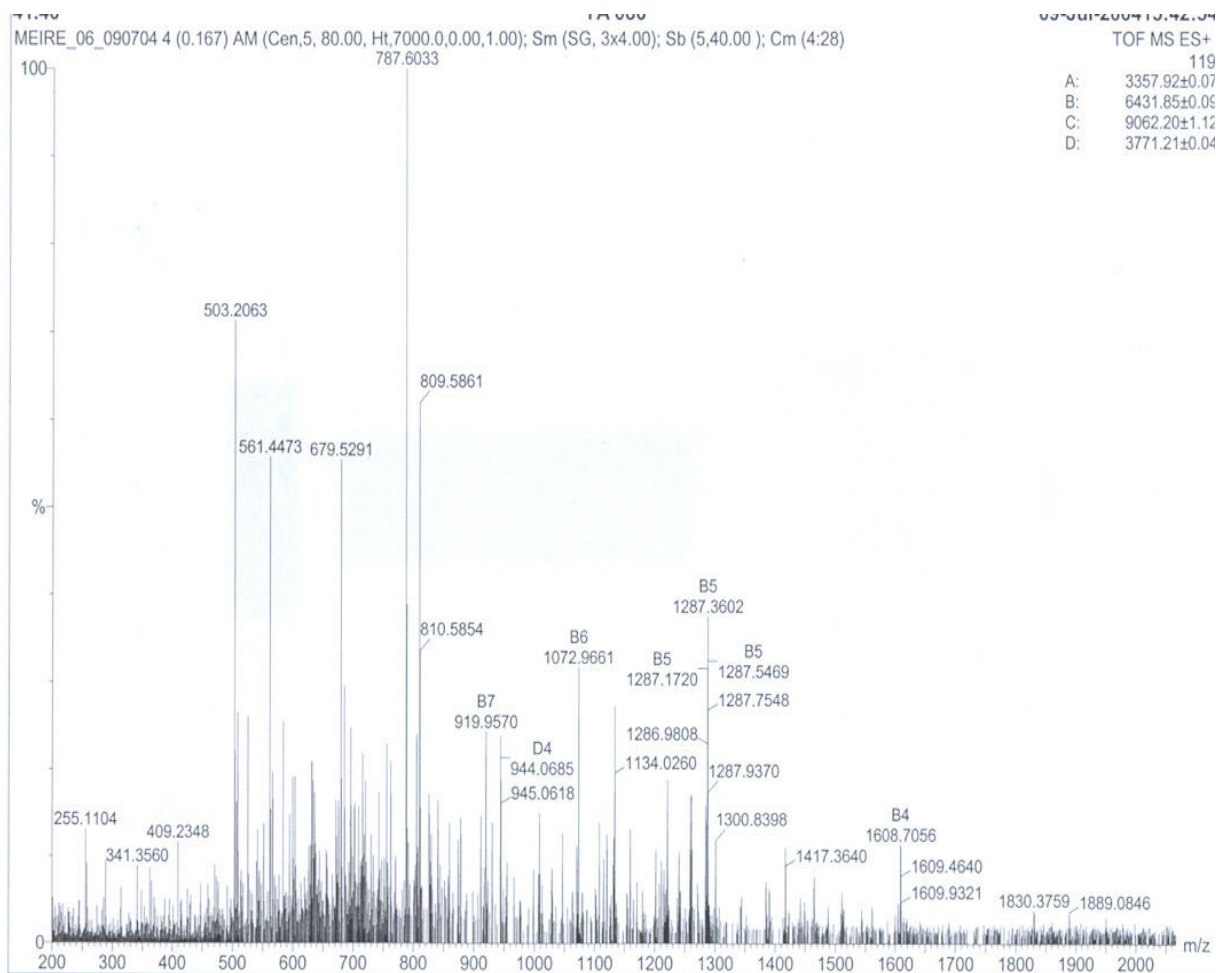
Como evidência indireta de que proteólise tenha ocorrido, observa-se que a diferença entre os peptídeos de 3.771,21 e 3.357,92 Da (Figura 26), de 413,29 Da, poderia corresponder à soma das massas médias dos aminoácidos alanina (71,08), arginina (156,18) e triptofano (186,21), que é 413, 47 Da. Vale ressaltar que, dois resíduos têm características hidrofóbicas e um, catiônica, que são freqüentes em peptídeos antimicrobianos catiônicos.



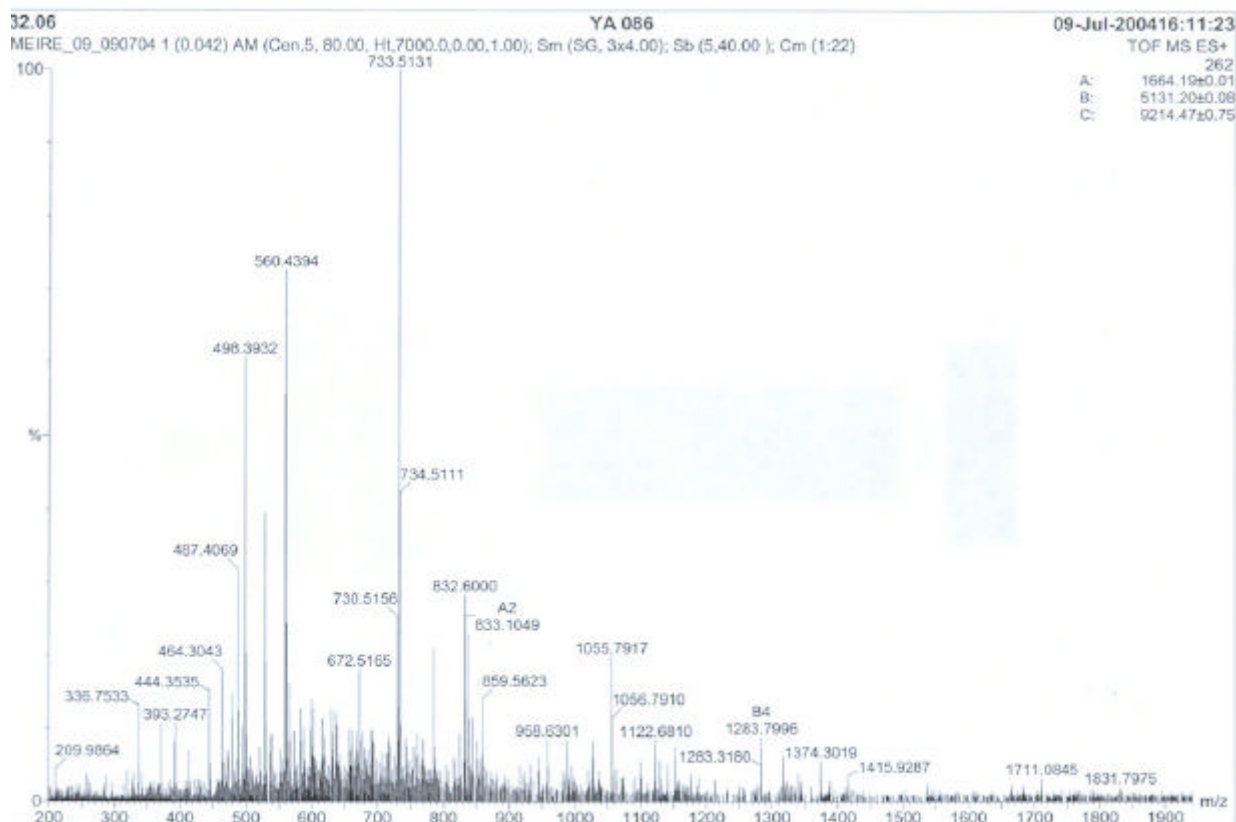
**Figura 24** - Espectrometria de massa do eluato do pico 5\*, eluído em 18,54% de acetonitrila na cromatografia de fase reversa (Figura 22) do *pool* da fração catiônica eluído com 0,35 M de NaCl da cromatografia de troca catiônica (Figura 13 C).

Entretanto, novas análises serão desenvolvidas para determinação de massas moleculares e seqüenciamento dos peptídios.

Apesar dos resultados não conclusivos salienta-se que as massas moleculares identificadas nesta amostras são na faixa peptídica de interesse em nosso trabalho e podem apresentar isoladamente atividades antimicrobianas relevantes.



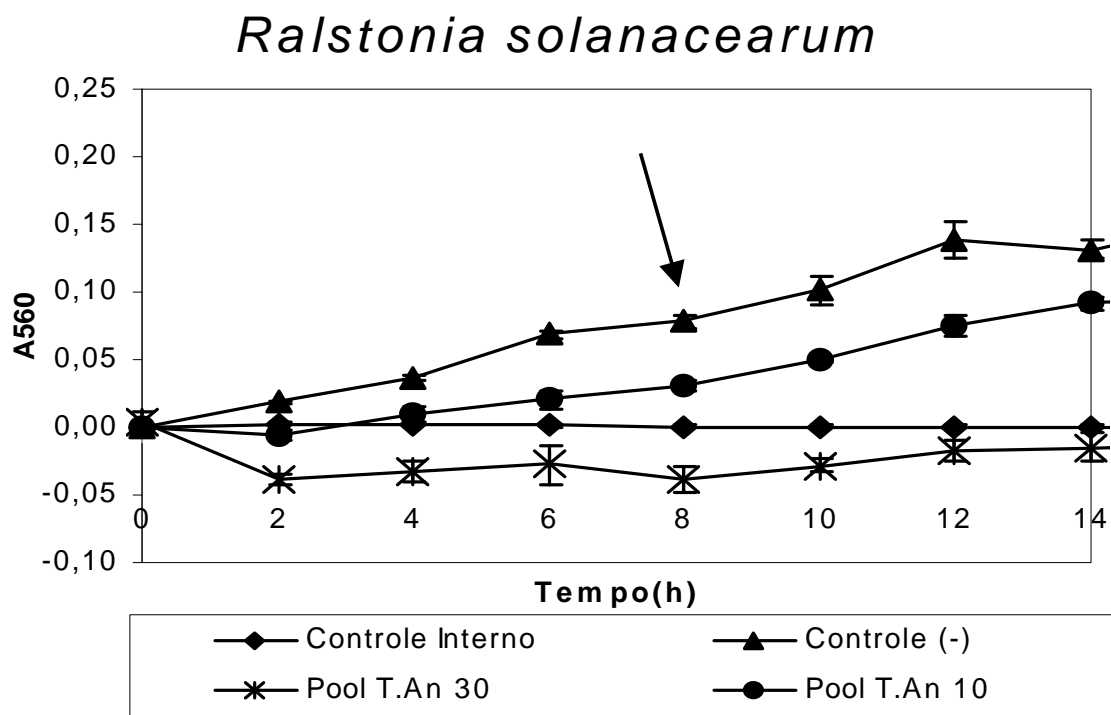
**Figura 25** - Espectrometria de massa do eluato do pico 8\*, eluído em 32,06% de acetonitrila na cromatografia de fase reversa (Figura 22) do *pool* da fração catiônica eluído com 0,35 M de NaCl da cromatografia de troca catiônica (Figura 13C).



**Figura 26** - Espectrometria de massa do eluato do pico 16\*, eluído em 31,4% de acetonitrila na cromatografia de fase reversa (Figura 22) do *pool* da fração catiônica eluído com 0,35 M de NaCl da cromatografia de troca catiônica (Figura 13 C).

### 5.3 - Avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídios parcialmente purificados sintetizados durante um período de germinação de 48h de sementes de soja

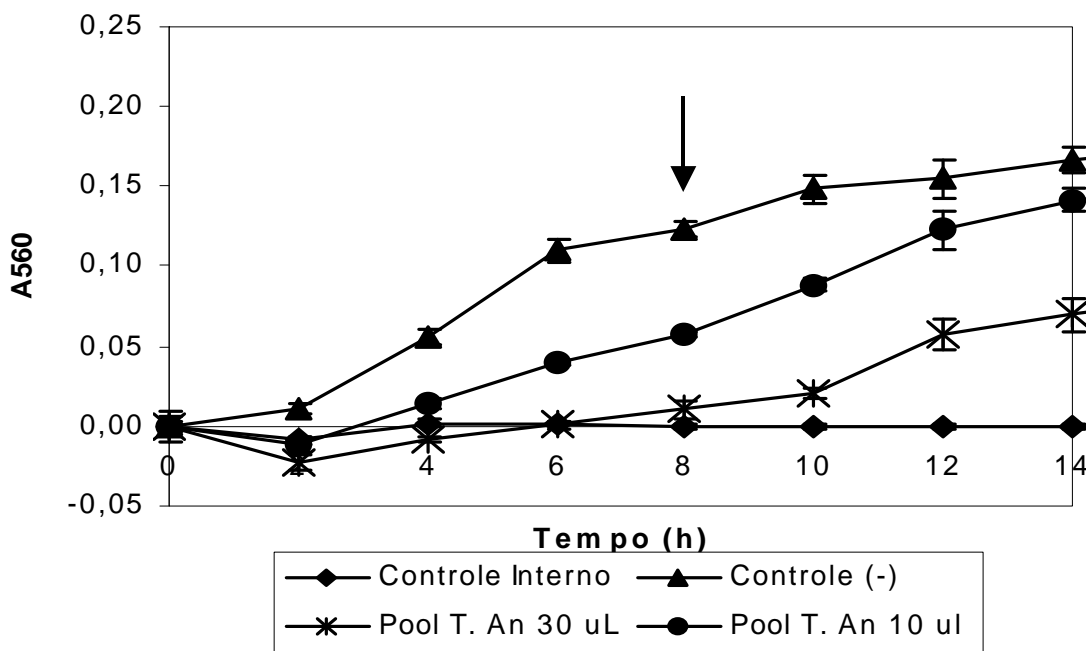
Testes de atividade antimicrobiana com os extratos protéicos parcialmente purificados de sementes de soja germinadas por 48h, foram realizados para as bactérias-teste *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Duas diferentes concentrações do *pool* catiônico obtido da cromatografia troca aniônica (Figura 11) foram utilizadas, e as curvas de cultivo obtidas em presença e em ausência da fração peptídica analisada mostraram que ocorreu a inibição parcial ou total do crescimento das bactérias *Ralstonia solanacearum* (Figura 27) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Figura 28).



**Figura 27** - Testes de inibição do crescimento da bactéria *Ralstonia solanacearum* em presença de duas concentrações diferentes (10 e 30  $\mu\text{L}$ ) do *pool* catiônico eluído da cromatografia de troca aniônica (T. An) de sementes de soja germinadas por 48h (Figura 11). O Controle Negativo (Controle (-)) corresponde ao cultivo dos microrganismos em ausência da fração peptídica, e o Controle Interno, ao cultivo na ausência da fração peptídica e da bactéria. As barras verticais correspondem aos desvios-padrão, originados de três repetições. Os volumes de 10  $\mu\text{L}$  e 30  $\mu\text{L}$  de extratos foram originados de 0,7 g e 2,1 g, respectivamente, de sementes de soja germinadas. A seta indica a região de intenso crescimento microbiano, cerca de 8h de cultivo.

Para a bactéria *Ralstonia solanacearum* (Figura 27), ao final das 12 h de cultivo houve estabilização da taxa de crescimento microbiano, observada no Controle Negativo. Em 14 h, observou-se uma inibição de cerca de 30% do crescimento quando em presença de 10 $\mu\text{L}$  da fração catiônica da troca aniônica, que foi obtida de 0,7 g de sementes de soja germinadas por 48h. Inibição total do crescimento foi observada quando em presença de uma quantidade três vezes maior da mesma fração protéica. Para o cultivo por cerca de 6 a 8 horas, foi observada inibição de cerca de 65% e inibição total, respectivamente, para as duas concentrações utilizadas, confirmando que o efeito antimicrobiano desses componentes é dependente de concentração. Além disso, menor efeito inibitório foi observado para as culturas ao final da fase de crescimento e início da fase

### *Clavibacter michiganensis* *subsp michiganensis*



**Figura 28** - Testes de inibição do crescimento da bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em duas concentrações diferentes (10 e 30  $\mu$ L) do *pool* catiônico eluído da cromatografia de troca aniônica (T. An) de sementes de soja germinadas por 48h. ). O Controle Negativo (Controle (-)) corresponde ao cultivo dos microrganismos em ausência da fração peptídica, e o Controle Interno, ao cultivo na ausência da fração peptídica e da bactéria. As barras verticais correspondem aos desvios-padrão, originados de três repetições. Os volumes de 10  $\mu$ L e 30  $\mu$ L de extratos foram originados de 0,7 g e 2,1 g, respectivamente, de sementes de soja germinadas. A seta indica a região de intenso crescimento microbiano, cerca de 8h de cultivo.

estacionária (Figura 27). Alternativamente, a concentração do agente inibidor peptídico poderia ser insuficiente para o grande número de células bacterianas presentes no período final de análise.

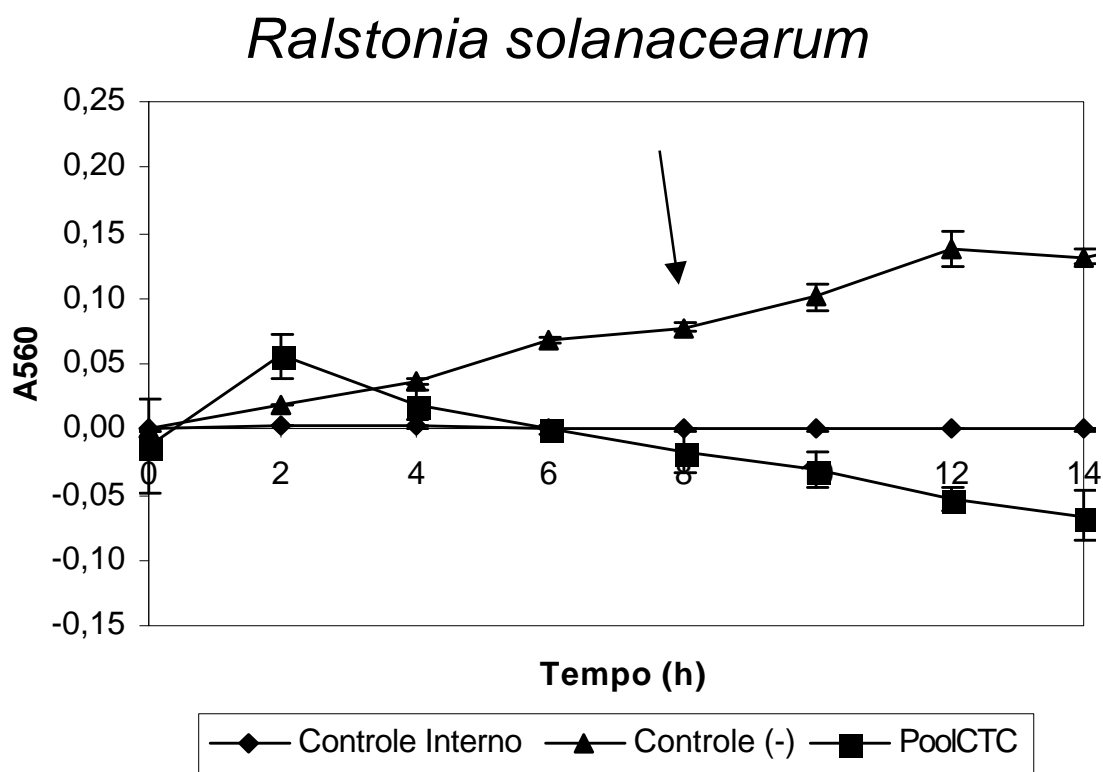
Análise similar, feita para o cultivo da bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ao final das 14h, indicou inibição média de cerca de 10% do crescimento bacteriano quando utilizou-se a concentração menor do extrato protéico (10  $\mu$ L), e inibição de cerca de 46% para o crescimento, quando utilizou-se quantidades três vezes maiores do extrato protéico (30  $\mu$ L). A avaliação em cerca de 8 horas de crescimento indicou a inibição de aproximadamente 50%

(maior que em 14 h) e 92% para as concentrações de 10 e 30  $\mu\text{L}$ , respectivamente (Figura 28), confirmando a dependência da concentração do agente inibitório. Os diferentes níveis de inibição observados ao longo do cultivo podem ser explicados à semelhança do descrito para a Figura 27.

Em um estágio mais avançado de purificação do extrato protéico, novos testes de atividade antimicrobiana para as bactérias-teste *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* foram realizados. Foi utilizado o *pool* catiônico da cromatografia de troca catiônica (Figura 13 C), eluído com 0,35 M de NaCl, que mostrou inibição total do crescimento para as duas bactérias-teste (Figuras 29 e 30). A quantidade de proteína presente na fração catiônica após a troca catiônica (Figura 13 C), utilizada nestes testes, foi correspondente à purificação de 18 g de semente de soja germinadas por 48 h para cada bactéria. Nesses testes, novamente infere-se que o grau de inibição do crescimento das bactérias foi dependente da concentração dos compostos inibitórios presentes nas frações peptídios usadas como amostra, já que o nível de inibição observado em 8 h de cultivo (região mediana do crescimento) foi maior do que a observada em 12-14h de cultivo (estabilização da taxa de crescimento microbiano).

Biologicamente, compostos análogos sintetizados artificialmente, não degradáveis pelos microrganismos, deverão ser desenvolvidos para essa finalidade, com base nas estruturas peptídicas identificadas e caracterizadas.

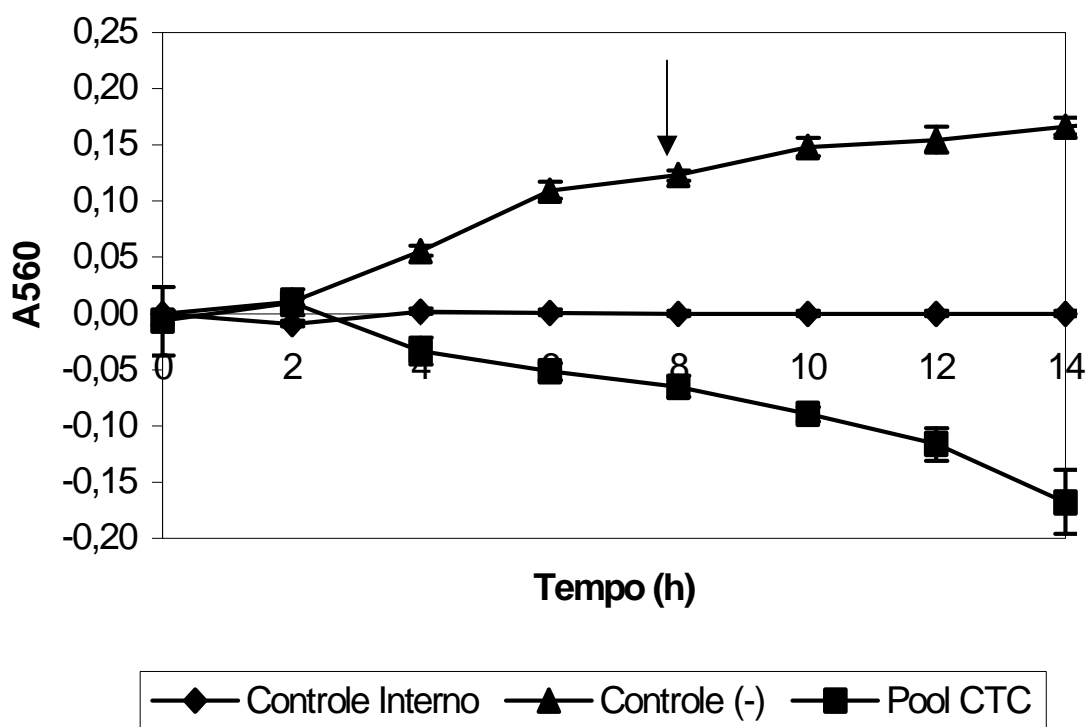
Testes de inibição com os eluatos protéicos das cromatografia de fase reversa foram realizados com os 14 picos recuperados individualmente e com os *pools* de proteínas identificados na primeira (Região A) e na segunda (Região B) regiões de síntese de diferentes proteínas das sementes de soja germinadas por 48 h (Figura 19) (dados não mostrados).



**Figura 29** - Testes de inibição do crescimento da bactéria *Ralstonia solanacearum* do *pool* catiônico eluído da cromatografia de troca Catiônica (T. Cat - Figura 13) de sementes de soja germinadas por 48h. O controle negativo (Controle (-)) corresponde ao cultivo dos microrganismos em ausência da fração peptídica e o Controle Interno, ao cultivo na ausência da fração peptídica e da bactéria. As barras verticais correspondem aos desvios-padrão originados de três repetições. Os volumes de 40  $\mu$ L de extrato corresponde a 18g de semente de soja germinadas. Seta indica a região de intenso crescimento microbiano, cerca de 8h de cultivo.

Para o *pool* da segunda região de síntese de diferentes proteínas (Região B, da cromatografia de fase reversa), obteve-se uma inibição total para as bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, tanto para cerca de 8 h como para 14 h de cultivo, sendo este *pool* total. Quando os 14 picos isolados da primeira região de síntese de diferentes proteínas foram avaliados como agentes antibacterianos, pequenos graus de inibição (inferiores a 10% do crescimento do controle interno) foram observados para 8 h de cultivo (na região mediana do crescimento), para as duas bactérias, não sendo observada inibição em 14h de cultivo (estabilização da taxa de crescimento microbiano). Cerca de 18 g de sementes germinadas deram origem às duas regiões A e B.

## *Clavibacter michiganensis* *subsp michiganensis*



**Figura 30** - Testes de inibição do crescimento da bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* do pool catiônico eluído da cromatografia de troca Catiônica (T. Cat) de sementes de soja germinadas por 48h. O controle negativo (Controle (-)) corresponde ao cultivo dos microrganismos em ausência da fração peptídica e o Controle Interno, ao cultivo na ausência da fração peptídica e da bactéria. As barras verticais correspondem aos desvios-padrão originados de três repetições. Os volumes de 40  $\mu$ L de extrato corresponde a 18g de semente de soja germinadas. Seta indica a região de intenso crescimento microbiano, cerca de 8h de cultivo.

Vale ressaltar que, para a bactéria *Ralstonia solanacearum*, os picos que apresentaram inibição parcial foram 2, 10, 12, 13, 14, e para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, foram os picos 1, 2, 3, 4, 8, 9 apresentados na Figura 19 (dados não apresentados), os quais não foram analisados por espectrometria de massa

Dentre os fatores que poderiam contribuir para o baixo poder inibitório dessas frações analisadas, pode-se citar: 1) a baixa concentração dos compostos peptídicos nessas amostras, já que a fração catiônica usada como amostra, e que

apresentou poder inibitório visto às Figuras 29 e 30, foi aqui fracionada em um grande número de picos da Região A e um *pool* da Região B da Figura 19; 2) o contato com a acetonitrila, que é um solvente orgânico com características apolares, podendo ser danoso à estrutura tridimensional de algumas formas peptídicas sob análise; 3) um possível sinergismo poderia estar ocorrendo entre formas peptídicas, gerando a alta inibição observada nas Figuras 29 e 30, efeito antimicrobiano esse que pode ter sido reduzido para os peptídios quando separados, mesmo quando em concentrações altas; 4) uma associação de fatores como a baixa concentração, acentuada pelo possível consumo dos peptídios pelos microrganismos, ação degradativa da acetonitrila e isolamento de peptídios com ação sinérgica. Ressalta-se ainda que alguns peptídios podem não exercer atividade antimicrobiana.

Lembrar que proteínas e peptídios podem também atuar como fonte de carbono para os microrganismos, e que o fator inibitório protéico poderia estar sendo insuficiente para exercer o poder inibitório e então ser consumido pelas bactérias, ocasionando a redução do componente protéico inibitório disponível, apesar de o meio de cultivo fornecer fontes de carbono mais facilmente disponíveis aos microrganismos.

Esses resultados indicaram que, para contornar qualquer dos fatores acima, seria necessária uma quantidade maior de material fonte (sementes germinadas) para obter peptídios purificados em quantidades suficientes para observar-se o poder inibitório de cada pico isoladamente.

E assim, poder desenvolver curvas de dose-resposta e, com isso, determinar a concentração de peptídios necessária à inibição de 50% do crescimento destes fitopatógenos e de outros microrganismos patogênicos.

## 6. CONCLUSÕES

Os protocolos de extração e purificação permitiram a separação de peptídios com atividade antimicrobiana, embora algumas frações necessitem de melhor separação. Semente de soja germinada por 48 h foi capaz de sintetizar um conjunto de peptídios diferentes quando comparada com a semente de soja não germinada ou germinada por outros períodos (24, 72 e 96 h). Nesse conjunto, puderam-se distinguir dois grupos de peptídios, sendo um com massas moleculares maiores e outro de massas moleculares menores. Os resultados obtidos até o momento indicaram a presença de peptídios com massas moleculares 1.305,89; 1.664,19; 2.467,32; 2.597,39; 3.357,92; 3.771,21; 5.131,20; 6.431,85; 9.062,20 e 9.214,47 Da.

Os extratos peptídicos parcialmente purificados inibiram totalmente o crescimento das bactérias fitopatogênicas *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (gram-positiva) e *Ralstonia solanacearum* (gram-negativa). A inibição foi dependente de concentração, já que resultados preliminares sugerem que alguns peptídios isolados, presentes nestas frações, inibem o crescimento destas bactérias para baixas concentrações celulares, reduzindo a inibição para culturas com maior número de células microbianas. Maiores concentrações de extratos peptídicos promoveram maiores níveis de inibição das bactérias-teste.

Ação proteolítica pode estar promovendo a redução do nível de atividade antimicrobiana ao longo do cultivo, sugerindo que, para aplicação biotecnológica, torna-se necessário o desenvolvimento de agentes antimicrobianos análogos aos peptídios em questão. Esses compostos deverão ser sintetizados artificialmente, com base nas estruturas peptídicas identificadas e caracterizadas a partir de compostos naturais, e não devem ser degradáveis pelos microrganismos.

## 7. PERSPECTIVAS

O protocolo utilizado para purificação de peptídios de sementes de soja germinadas necessita ser ajustado visando obter formas peptídicas isoladas e em quantidades suficientes para testes de caracterização posteriores. Resultados preliminares sugerem que o uso da gel filtração como etapa cromatográfica para separar proteínas de massas moleculares (20-50 kDa) pode auxiliar na obtenção de peptídios isolados e eliminar a possível ação proteolítica. Outra possibilidade é o uso de um microfiltro de membrana de volume de exclusão de 10 kDa, visando obter maior quantidade de peptídios puros para as caracterizações diversas de peptídios com atividade antimicrobiana. Após a identificação destes peptídios, é objetivo clonar e expressar 2 a 4 peptídios selecionados com atividade antimicrobiana, de interesse na agroindústria para obter quantidades suficiente ao desenvolvimento de caracterizações estruturais e atividade antimicrobianas contra outros fitopatógenos de interesse comercial. As formas peptídicas de maior interesse serão caracterizadas quanto à sua estrutura, concentração inibitória mínima (MIC), testes de toxicidez para células animais, imunolocalização celular e identificação de mecanismos de ação.

Visa-se seqüenciar o N-terminal da proteína de massa molecular de 23 kDa em seqüenciador automático, a ser realizado no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas, no ICB/UFMG, sob coordenação do Prof. Marcelo Porto Bemquerer, e proceder análise de seqüência em bancos de dados da Rede Mundial de Computadores, para classificar proteínas ou peptídios diferentes sintetizados durante a germinação. Os demais picos da região de proteínas com massas moleculares maiores também serão analisadas, já que o *pool* apresentou atividade antimicrobiana considerável.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, M. S.; Cabral, K. M. S.; Zingali, R. B. and Kurtenbach, E. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **378** (2): 278-286, 2000.
- Aumelas, A.; Mangoni, M.; Roumestand, C.; Chiche, L.; Despaux, E.; Grassy, G.; Calas, B. and Chavanieu, A. Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur J Biochem*, **237**: 575-583, 1996.
- Boman, H. G. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: An update review. *Scand. J. Immunol.* **48**: 15-25, 1998.
- Boman, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **13**: 61-92, 1995.
- Bulet, P.; Dimarcq, JL; Hetru, C.; Lagueux, M.; Charlet, M.; Hegy, G.; Van Dorsselaer, A. and Hoffmann, J.A. A novel inducible antibacterial peptide produced of *Drosophila* carries an O-glycosilated substitution. *J. Biol. Chem.*, **268**: 14893-14897, 1993.
- Broekaert, W. F.; Terras, F. R. G.; Cammue, B. P. A. and Vanderleyden, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol. Lett.*, **69**: 55-60, 1990.
- Broekaert, W. F.; Mariën, W.; Terras, F. R. G.; De Bolle, M. F. C.; Proost, P.; Damme, J. V.; Dillen, L.; Claeys, M.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J. and Cammue, B. P. A. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, **31**: 4308-4314, 1992.
- Broekaert, W. F.; Terras, F. R. G.; Cammue, B. P. A. and Osborn, R. W. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.*, **108**: 1353-1358, 1995.
- Broekaert, W. F.; Cammue, B. P. A.; De Bolle, M. F. C.; Thevissen, K.; De Samblanx, G. W. and Osborn, R. W. Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sc.*, **16**: 297-323, 1997.
- Bruix, M.; Jiménez, M. A.; Santoro, J.; González, C.; Colilla, F. J.; Méndez, E. and Rico, M. Solution structure of gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by <sup>1</sup>H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry*, **132**: 715-724, 1993.
- Cammue, B. P. A.; De Bolle, M. F. C.; Terras, F. R. G.; Proost, P.; Damme, J. V.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J. and Borekaert, W. F. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.*, **267**: 2228-2233, 1992.

- Carvalho, A. O.; Machado, O. L. T.; Cunha, M. D.; Santos, I. S. and Gomes, V. M. Antimicrobial peptides and immunocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiol. Biochem*, **39**: 137-146, 2001.
- Christensen B, F. J., Merrifield R. B. and Mauzerall, D. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5072-5076, 1988.
- Cociancich, S.; Ghazi, A.; Hétru, C.; Hoffman, J. A. and Letellier, L. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.*, **268**: 19239-19245, 1993.
- Cornelissen, B. J. C. and Melchers, L. S. Strategies for control of fungal disease with transgenic plants. *Plant Physiol.*, **101**: 709-712, 1993.
- Cots, J.; Widner, F. Germination, senescence and pathogenic attack in soybean (*Glicine max. L.*): identification of the cytosolic aconitase participating in the glyoxylate cycle. *Plant Science*, **149**: 95-104, 1999.
- Fernandez de Caleyá, R. ; Gonzales-Pascual, B.; Garcia-Olmedo, F. and Carbonero, P. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothins in vitro. *Appl Microbiol*, **23**: 998-1000, 1972.
- Fogaça, A. C.; Lorenzini, D. M.; Kaku, L. M.; Esteves, E.; Bulet, P. and Daffre, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental e Comparative Immunology* **28**: 191- 200, 2004
- Ganz, T. and Lehrer, R.I. Defensins. *Curr. Opin. Immunol.*, **6**: 584-589, 1994.
- Ganz, T. and Lehrer, R. I. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: Biology and applications. *Molec. Medicine Today*, **5**: 292-297, 1999.
- Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamillo, J. M. and Rodríguez-Palenzuela, P. Plant defense peptides. *Biopolymers*, **47**: 479-491, 1998.
- García-Olmedo, F.; Rodríguez-Palenzuela, P.; Molina, A.; Alamillo, J. M.; López-Solanilla, E.; Berrocal-Lobo, M. and Poza-Carrión, C. Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxy-nitrite in plant defense. *FEBS Lett.*, **498**: 219-222, 2001.
- Gartemann, K. H.; Kirchner, J. E.; Grafen, I.; Eichenlaub, R. and Burgere, A. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of gram-positive phytopathogenic bacterium. *J. of Biotechnology*, **106**: 179-191, 2003.
- Gillespie, J. P. and Kanost, M. R. Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.*, **42**: 611-643, 1997.
- Gomes, V. M. and Xavier-Filho, J. Biochemical defense of plants. *Arq. Biol. Tecnol.*, **37**: 371-383, 1993.

- Gomes, V. M.; Oliveira, A. E. A. and Xavier-Filho, J. A chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanase isolated from seeds of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inhibit the growth of fungi and insect pests of the seed. *J. Sci. Food Agric.*, **72**: 86-90, 1996.
- Gomes, V.M.; Okorokov, L.A.; Rose, T.L.; Fernandes, K.V. and Xavier-Filho, J. Legume vicilins (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1379**: 207-16, 1998.
- Hancock, R. E. W. and Lehrer, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, **16**: 82-88, 1998.
- Hancock, R. E. W. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. *Trends in Microbiology*, **8**: 402-410, 2000.
- Hancock, R. E. W. and Rezek, A. Role of membranes in the actives of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, **206**: 143-149, 2002.
- Hancock, R.E.W. and Scott, M.G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *PNAS*. **97**: 8856-8861, 2000.
- Harbone, J. B. Introduction to Ecological Biochemistry. H. B. Jovanosvish, Ed. Acad. Press Inc., London, 1982.
- Harlow, E. and Lane, D. Antibodies – A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York, 1988. 726 p.
- Heaney, S; Slawson, D.; Hollomon, D. W.; Smith, M.; Russell, P. E. and Parry, D. W., Fungicide Resistance. *Thornton Heath: British Crop Protection Council*, 1994.
- Heinemann, J. A.; Ankenbauer, R. G. and Amibile-Cuevas, C. F. Do antibiotics maintain antibiotic resistance? *DDT*, 5:195-204, 2000.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. Characterization of a solvent system for separation of water-insoluble poliovirus proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis*, **6**: 103, 1985.
- Hiemstra, P. S.; Epithelial antimicrobial peptides and proteins: their role in host defence and inflammation, *Paediatric Respiratory Reviews*, **2**, 306-310, 2001.
- Hoffman, J. A. and Hétru, C. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunol. Today*, **13**: 411-415, 1992.
- Hoffman, J. A. Innate immunity of insects. *Curr. Opinion in Immunol.*, **7**: 4-10, 1995.
- Judd, R. C., Electrophoresis of peptides. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 32: *Basic Protein and Peptide Protocols*, Ed. J. M. Walker Copyright, Humana Press Inc, Totowa, NJ, 1994. P. 49-57

- Kader, J. C. Lipid-transfer proteins: a pussling family of plant proteins. *Trends Plant Sc.* **2**: 66-70, 1996.
- Kalfa, V.C. and Brogden, K. A. Anionic antimicrobial peptide-lysozyme interactions in innate pulmonary immunity. *Intern. J. Antimicrob. Agents.* **13**: 47-51, 1999.
- Knight, S. C.; Anthony, V. M.; Brady, A. M.; Greenland, A. J.; Heaney, S. P.; Murray, D. C.; Powell, K. A.; Schulz, M. A.; Spinks, C. A.; Worthington, P. A. and Youle, D. Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **35**: 349-372, 1997.
- Kobayashi, Y.; Sato, A.; Takashima, H.; Nishimura, S.; Kyogoku, Y.; Ikenaka, K.; Kondo, T.; Mikoshiba, K.; Hojo, H.; Aimoto, S. and Moroder, L. A new  $\alpha$ -helical motif in membrane active peptides. *Neurochem. Int.*, **18**: 523-534, 1991.
- Kushmerick, C.; Castro, M. S.; Cruz, J. S.; Bloch Jr., C and Beirão, P. S. L. Functional and structural features of  $\gamma$ -zeathionins, a new class of sodium channel blockers. *FEBS Letters*, **440**: 302-306, 1998.
- Lai, R.; Lui, H.; Lee, W. H. and Zhang, Y. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochem. Biophys. Reser. Commum.*, **295**: 796-799, 2002.
- Lehrer, R. L.; Lichtenstein, A. K. and Ganz, T. Defensins – antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.*, **11**: 105-128, 1993.
- Lehrer, R. L. and Ganz, T. Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr. Opin. Hematol.*, **9**: 18-22, 2002.
- Liang, J.F. and Kim, S. C. J. Not only the nature of peptide but also the characteristics of cell membrane determine the antimicrobial mechanism of a peptide. *Peptide Res.*, **53**: 518-522. 1999.
- Lohner, K. The role of membrane lipid composition in cells targeting of antimicrobial peptides. In "Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies. Lohner, K. (Ed), Horizon Scientific Press, England, 2001. pp. 149-165.
- Mansfield, J. W. Antimicrobial compounds Biochemical. *Plant Pathology*, 237-265, 1983.
- Mauch. F.; Mauch-Mani, B. and Boller, T. Antifungal hidrolases in pea tissue. Inhibition of fungal growth by combination of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**:399-429, 1988.
- Meyer, T.S. and Lamberts, B.L. Use of coomassie brilliant blue R 250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta*, **107**: 144, 1965.

- Molina, A.; Segura, A. and Garcia-Olmedo, F. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.*, **316**: 119-122, 1993.
- Osborn, R. W.; De Samblanx, G. W.; Thevissen, K.; Goderis, I.; Torrekens, S.; Leuven, F. V.; Attenborough, S.; Rees, S. B. and Broekaert, W. F. Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hecatanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Letters*, **368**: 257-262, 1995.
- Osusky, M.; Zhou, G.; Osusky, L.; Hancock, R. E.; Kay, W. W. and Misra, S. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnology*, **18**: 1162 - 1166, 2000.
- Papagianni, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications, *Biotechnol. Adv.* **21**: 465-499, 2003.
- Papo, N. and Shai, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides* **24**: 1693-1703, 2003.
- Park, C. J.; Park, C. B.; Hong, S. S.; Lee, H. S.; Lee, S. Y. and Kim, C. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. *Plant. Mol. Biol.*, **44**: 187-197, 2000.
- Pharmacia Biotech. Ion Exchange Chromatography - Principles and Methods, Ed. Ac 18-1022-19
- Raikhel, N. V.; Lee, H. I. and Broekaert, W. F. Structure and function of chitin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **44**:591-615, 1993.
- Romeiro, R. S.; Neto, J. R., Diagnose de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. Cadernos Didáticos, Editora UFV nº **78**: 13-16, 2001
- Rozek A.; Friedrich, C.L. and Hancock, R.E. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry*, **39**:15765-15774, 2000.
- Schröder, J. M. Epithelial peptide antibiotics. *Biochemical Pharmacol.*, **57**: 121-134, 1999.
- Segura, A.; Moreno, M. and Garcia-Olmedo, F. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. *FEBS Lett.*, **332**: 243-246, 1993.
- Segura, A.; Moreno, M.; Madueño, F.; Molina, A. and Garcia-Olmedo, F. Snakin-1 a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Molec. Plant-Microbe Int.*, **12**: 16-23, 1999.
- Segura, A.; Moreno, M.; Molina, A. and Garcia-Olmedo, F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*) *FEBS Letters*, **435**: 159-162, 1998.

- Shewry, P. R. and Lucas, J. A. Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. *Adv. Bot. Res.*, **26**: 135-192, 1997.
- Shutov, A.D. and Vaintraub, I.A. Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry*, **26**: 1557–1566, 1987.
- Simmaco, M.; Mignogna, G. and Barra, D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: What do they tell us? *Biopolymers*, **47**: 435-450, 1998.
- Steffens, J. J.; Pell, E. J. and Tien, M. Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. *Curr. Opinion in Biotech.*, **7**:348-355, 1996.
- Tailor, R. H.; Acland, D. P.; Attenborough, S.; Cammue, B. P. A.; Evans, I. J.; Osborn, R. W. and Ray, J. A.; Rees, S. B. and Broekaert, W. F. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J. Biol. Chem.*, **272**: 24480-24487, 1997.
- Tam, J. P.; Yi-An, L.; Jin-Long, Y. and Koiu-Wei, C. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 8913-8918, 1999.
- Tan-Wilson, A. L.; Liu X.; Chen, R; Qi, X. and Wilson, K. A. An Acidic Amino Acid-Specific Protease From Germinating Soybeans. *Phytochemistry*, **42(2)**: 313-319, 1996
- Tanaka, M. A. S., Passos, F. A. and Betti, J. A. Resistência de *Colletotrichum fragariae* e *C. acutatum* ao Benomyl na cultura do morango no estado de São Paulo *Sci. Agric.*, **54** (3): 9003-9016, 1997.
- Tang, Y. Q.; Yuan, J.; Osapay, G.; Osapay, K.; Tran, D. and Miller, C.J.; Ouellette, A.J. and Selsted, M.E. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated  $\alpha$ -defensin. *Science*, **286**: 498-502, 1999.
- Tejada, G. M.; Pizzaro-Cerda, J.; Moreno, E. and Moriyon, I. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect. Immun.*, **63**: 3054-3061, 1995.
- Terras, F. R. G.; Eggermont, K.; Kovaleva, V.; Raikhel, N. V.; Osborn, R. W.; Kester, A.; Rees, S. B.; Torrekens, S.; Leuven, F. V.; Vanderleyden, J.; Cammue, P. A. and Broekaert, W. F. Small cysteine-rich antifungal proteins from Radish: Their role in host defense. *Plant Cell*, **7**: 573-588, 1995.
- Terras, F. R. G.; Schoofs, H. M. E.; De Bolle, M. F. C.; Leuven, F. V.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J.; Cammue, P. A. and Broekaert, W. F. Analysis two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.*, **267**: 15301-15309, 1992.
- Terras, F. R. G.; Torrekens, S.; Van, Leuven, F.; Osborn, R. W.; Vanderleyden, J.; Cammue, B. P. A. and Broekaert, W. F. A new family of basic cysteine-rich

- plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett.*, **316**: 233-240, 1993.
- Thevissen, K.; Cammue, B. P. A.; Lemaire, K.; Winderickx, J.; Dickson, R. C.; Lester, R. L.; Ferket, K. K. A.; Even, F. V.; Parret, A. H. A. and Broekaert, W. F. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *PNAS.*, **15**: 9531-9536, 2000.
- Thevissen, K.; Ghazi, A.; De Samblanx, G. W.; Brownlee, C.; Osborn, R. W. and Broekaert, W. F. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.*, **271**: 15018-15025, 1996.
- Wang, X.; Bunkers; G. J.; Walters, M. R. and Thoma, R. S. Purification and characterization of three antifungal proteins from cheeseweed (*Malva passiflora*). *Biochem. Biophys. Reser. Commum.*, **282**: 1224-1228, 2001.
- Williams, J. S. and Cooper, R. M. Elemental sulphur is produced by diverse families as a component of defense against fungal and bacterial pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**: 3-16, 2003
- Xavier-Filho, J. Proteínas de defesa de sementes *Vigna unguiculata*. Programas e Resumos do I Encontros de Biotecnologia Vegetal: Brasília, 1993.
- Xavier-Filho, J.; Sales, M. P.; Fernandes, K. V. S. and Gomes, V. M. A resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Collosobruchus maculatus*) is due to the association of variant vicilins (7S storage proteins) to chitinous structures in insect's midgut. *Arq. Biol. Technol.*, **39**: 693-699, 1996.
- Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicelular organisms. *Nature*, **415**: 389-395, 2002.